

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

DIPLOMSKI RAD
TROMBOCITNI SEROTONIN U DJECE S
POREME AJEM PAŽNJE I
HIPERAKTIVNOŠ U

Ines Petek

Zagreb, 2009.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Neli Pivac, znanstvenoj savjetnici, koja mi je nesebično pomogla prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Najiskrenije zahvaljujem dipl. ing. Gordani Nedić koja mi je pomagala u biokemijskim odredivanjima, savjetovala me, bila puna strpljenja, razumijevanja i uputila me u laboratorijski rad. Zahvaljujem profesorici dr. sc. Dubravki Kocijan Hercigonja iz Poliklinike Kocijan/Hercigonja, Zagreb, na psihijatrijskoj evaluaciji djece.

Zahvaljujem Marcelu kao i cijeloj svojoj obitelji na pruženoj pomoći i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

«Trombocitni serotonin u djece s poremećajem pažnje i hiperaktivnošću»

Ines Petek

Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju

Zavod za molekularnu medicinu

Institut Ruđer Bošković

Bijenjska cesta 54

Zagreb

SAŽETAK

Poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (ADHD) je psihijatrijski poremećaj, čija neurobiološka osnova nije potpuno jasna, ali je povezana sa promijenjenim funkcioniranjem dopaminergičkog, noradrenergičkog i serotonergičkog (5-HT) sustava. Koncentracija trombocitnog 5-HT promijenjena je u određenim ponašanjima (agresivno, impulzivno) i kognitivnim poremećajima, koji prate ADHD. U radu su korišteni trombociti kao ograničeni periferni model središnjih 5-HT sinaptosoma, jer sliče na spremaju, otpuštaju i metaboliziraju 5-HT. Koncentraciju trombocitnog 5-HT odredili smo u skupinama djece s ADHD i kontrolne zdrave djece, te istražili moguć i utjecaj spola na koncentraciju trombocitnog 5-HT. Rezultati su pokazali nedostatak značajnih razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između muške i ženske djece oboljele od ADHD i zdrave djece. Nisu pronađene spolno uvjetovane razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT. Ti podaci upućuju na zaključak da ADHD nije vezan za promijenjenu koncentraciju trombocitnog 5-HT. Periferni biološki pokazatelj kao što je trombocitni 5-HT vezan je za određena ponašanja ili simptome promijenjene u ADHD, i njegova se koncentracija ne može se koristiti kao periferni biološki pokazatelj kompleksnog dijagnostičkog entiteta kao što je ADHD.

(43 stranice, 21 slika, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Serotonin (5-HT), trombociti, ADHD, djeca

Voditelj: Dr. sc. Nela Pivac, znanstvena savjetnica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

«Platelet serotonin in children with attention deficit/ hyperactivity disorder»

Ines Petek

Laboratory for molecular neuropsychiatry

Division of molecular medicine

Ruder Bošković Institute

Bijenikova cesta 54

Zagreb

ABSTRACT

Attention deficit/ hyperactivity disorder (ADHD) is a psychiatric disorder with unclear neurobiological background, thought to be associated with altered dopaminergic, noradrenergic and serotonergic (5-HT) systems functions. Platelet 5-HT concentration is changed in particular behaviors (aggressive, impulsive) and cognitive disturbances, related to ADHD. The study used platelets as a limited peripheral model of the central 5-HT synaptosomes, since they use, release and metabolize 5-HT similarly as central 5-HT synaptosomes. Platelet 5-HT concentration was determined in groups of children with ADHD and healthy control children, and the possible influence of sex on platelet 5-HT concentration was also evaluated. The results showed the lack of significant differences in platelet 5-HT concentration between boys and girls with ADHD and control boys and girls. No significant sex related differences in platelet 5-HT concentration were found. The findings suggest that ADHD is not associated with altered platelet 5-HT concentration. Peripheral biological marker such as platelet 5-HT is related to specific behaviors or symptoms altered in ADHD, and platelet 5-HT concentration could not be used as a peripheral biological marker of a complex diagnostic entity such as ADHD.

(43 pages, 21 figures, original language: Croatian)

Thesis is deposited in the central library of biology

Key words: Serotonin (5-HT), platelets, ADHD, children

Supervisor: Nela Pivac, DVM, PhD, senior scientist

KRATICE:

5-HT - 5 - hidroksitriptamin, serotonin

5-HTP - 5 - hidroksitriptofan

5-HTT - serotoniniski transporter

AADC - dekarboksilaza L - aromatskih aminokiselina

ADHD - attention deficit/ hyperactivity disorder

ACTH - adrenokortikotropni hormon

Ach - acetilkolin

ANOVA – analiza varijance

APA- American Psychiatric Association, ameri ko psihijatrijsko udruženje

CNS – središnji živ ani sustav

DA - dopamin

DSM-IV - Diagnostic Statistical Manual, Dijagosti ki i statisti ki priručnik za mentalne poreme taje, IV revizija

GABA - - aminomasla na kiselina

Glu - glutamat

GI - gastrointestinalni

NA - noradrenalin

MAO - monoaminooksidaza

OCD - opsesivno - kompulzivni poreme taji

PD - poreme taji li nosti

PTSP - posttraumatski stresni poreme taji

SBP – serotonin binding protein, protein koji veže 5-HT

Trp - triptofan

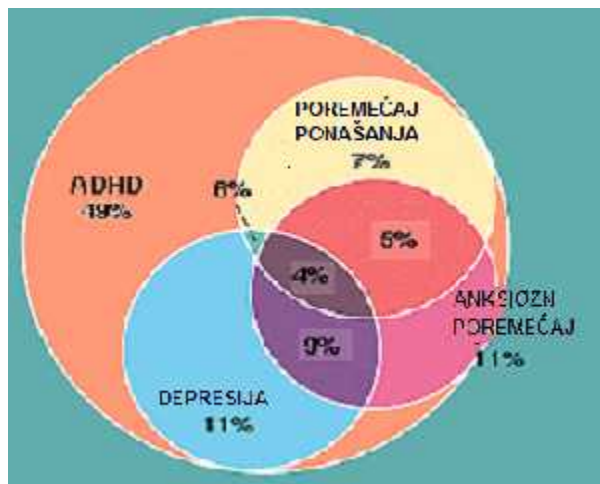
SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	ADHD	1
1.2	SIMPTOMI ADHD	2
1.3	UZROCI POREMEĆAJA	5
1.4	SEROTONIN	7
1.5	METABOLIZAM SEROTONINA	8
1.6	SREDIŠNJI I PERIFERNI SEROTONIN	11
1.7	SEROTONIN KAO NEUROTRANSMITOR	12
1.8	SEROTONINSKI RECEPTORI	14
1.9	SEROTONIN I PONAŠANJE	14
1.10	SEROTONIN I ADHD	15
1.11	TROMBOCITNI SEROTONIN	17
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3	MATERIJALI I METODE	23
3.1	SKUPINE ISPITANIKA	23
3.2	ODREĐIVANJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA	25
3.3	ODREĐIVANJE PROTEINA (PO LOWRYJU)	27
3.4	TEHNIKE POMAGALA	27
3.5	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	28
4	REZULTATI	29
4.1	KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJECE S ADHD I U KONTROLNE DJECE	29
4.2	KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA S ADHD I U KONTROLNIH DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA	29
4.3	KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA S ADHD	30
4.4	KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U KONTROLNIH DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA	31
4.5	GODINE ŽIVOTA (DOB) U DJECE S ADHD I U KONTROLNE DJECE	32
4.6	KOLERACIJA IZMJERENJA U DOBI I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJECE S ADHD	33
4.7	KOLERACIJA IZMJERENJA U DOBI I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA U KONTROLNE DJECE	34
5	RASPRAVA	36
5.1	KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJECE ADHD I U ZDRAVE DJECE	36
5.2	NEDOSTATAK SPOLNO IZAZVANIH PROMJENA U KONCENTRACIJI TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA S ADHD I U KONTROLNIH DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA	39
5.3	ADHD I RAZLIČITE PSIHIJATRIJSKE BOLESTI	40
6	ZAKLJUČAK	43
7	LITERATURA	44

1 UVOD

1.1 ADHD

Poreme aj pažnje s hiperativnoš u ili ADHD (prema engl. attention deficit/hyperactivity disorder) je kompleksan psihijatrijski poreme aj. Prema Dijagosti kom i statisti kom priru niku za mentalne poreme aje, kojeg je izdalo ameri ko psihijatrijsko društvo 1994 godine (APA, 1994), ADHD je poreme aj u kojem dominiraju tri karakteristi ne skupine simptoma: nepažnja, hiperaktivnost i impulzivnost (APA, 1994; Kocijan-Hercigonja i Karlovi , 1999; Biederman, 2005). ADHD se u literaturi može na i i pod nazivom "hiperkineti ki sindrom" ili "minimalna cerebralna disfunkcija".



Slika 1.1. Preklapanje ADHD s drugim psihi kim poreme ajima / slika preuzeta iz www.ncpamd.com/ADD_Co1.gif

Postoje tri tipa ADHD:

- deficit pažnje / hiperaktivni poreme aj, predominantno nepažljiv tip
- deficit pažnje / hiperaktivni poreme aj, predominantno hiperaktivno-impulzivan tip
- deficit pažnje / hiperaktivni poreme aj, kombiniran tip

Predominantno hiperaktivno-impulzivan tip i kombiniran tip lakše se dijagnosticiraju i identificiraju, zbog vidljivih simptoma koje djeca pokazuju. Takva djeca su vrlo glasna, konstantno su u pokretu, esto se bave opasnim aktivnostima te nerijetko nepristojno odgovaraju odraslima. Predominantno nepažljiv tip od kojeg esto boluju ženska djeca, obuhvaća tzv. "tihe sanjare". Takva djeca ne mogu raditi samostalno, gube stvari, i esto se izgube u vlastitim mislima (APA, 1994).

ADHD se javlja prije sedme godine života. Primjećeno je da se u osnovnoškolskoj dobi broj djece s ADHD poremećajem kreće od 1-4% (3-5%), a prema nekim istraživanjima i do 20%, a razlike u postocima ovise o upotrijebljenim dijagnostičkim instrumentima i metodama. U oko 75% djece poremećaj se nastavlja u adolescenskom periodu, a kod 50% osoba ADHD perzistira i u odrasloj dobi. Odnos dječaka i djevojčica s ADHD je 1:3 – 1:4, što znači da se taj poremećaj javlja 2-3 puta češće kod dječaka nego kod djevojčica. Dokazano je i da se kod djevojčica češće javlja simptom poremećaja pažnje (Biederman, 2005; Kocijan-Hercigonja i sur., 2006).



Slika 1.2. Poremećaj pažnje se češće javlja u djevojčica

1.2 SIMPTOMI ADHD

Za dijagnozu ADHD-a treba biti prisutno barem šest simptoma nepažnje ili barem šest simptoma hiperaktivnosti i impulzivnosti.

NEPAŽNJA:

- ne posvećuju pažnju detaljima ili rade pogreške zbog nemara u školskom uratku, poslu ili drugim aktivnostima
- često imaju teškoće u održavanju pažnje pri obavljanju zadatka ili u igri
- često se čini da ne slušaju i kad im se direktno obraćaju
- često ne prate upute i ne dovršavaju kućne poslove ili dužnosti na radnom mjestu (ne zbog prkosa ili nerazumijevanja uputa)
- često imaju teškoće s organiziranjem zadataka i aktivnosti
- često gube stvari potrebne za ispunjavanje zadatka ili aktivnosti
- često ih ometaju vanjski podražaji
- često zaboravljaju dnevne aktivnosti

HIPERAKTIVNOST:

- često tresu rukama i nogama ili se vrpolu na stolcu ili sjedalu
- ustaju sa stolca u razredu ili negdje drugdje gdje se očekuje da ostanu na mjestu
- često pretjerano trče ili se penju u situacijama u kojima je to neprikladno (kod adolescenata ili odraslih može biti ograničeno na subjektivni osjećaj nemira)
- često imaju teškoće ako se treba mirno i tiho igrati ili obavljati slobodne aktivnosti
- često su u „pogonu“
- često pretjerano pričaju



Slika 1.3. Hiperaktivno dijete

IMPULZIVNOST:

- esto „istr avaju“ s odgovorima prije nego što je dovršeno pitanje
- esto imaju poteško a s ekanjem reda
- esto prekida i ometa druge
- burno emotivno reagira, ne predvi aju i dobro posjedice
- djeluje prije nego što promisli
- prebacuje se s jedne aktivnosti na drugu
- ne može ekati da netko završi re enicu ili radnju
- prekida razgovor
- name e se s drugima
- ne eka upute

Uz smetnje aktivnosti i pažnje pojavljuju se i slijede a obilježja: neslušanje, neorganiziranost, nedovršavanje zapo etih aktivnosti, nemir i nestrpljivost.

Impulzivnost esto prati i emocionalna nestabilnost koja se izražava preko provala bijesa, socijalne izolacije, niske tolerancije na frustracije i preosjetljivosti.

Djeca s ADHD poreme ajem postaju problem kada zbog svog karakteristi nog ponašanja ne mogu zadovoljiti zadatke koje im postavljaju društvo, škola i obitelj. Kao posljedica tog poreme aja javlja se nisko samopoštovanje, slab školski uspjeh, te konflikti s autoritetima.

Osim navedenih, javljaju se i sekundarni poreme aji ponašanja kao što su anksioznost, depresija, tjeskoba, poreme aj u enja, poreme aji govora i jezika, alergije, no no mokrenje, nesanica (Rothenberger i sur., 2004; Biederman, 2005). Pojava kad se uz primarni poreme aj (u ovom slu aju je to ADHD) pojavljuju i drugi psihi ki poreme aji (sekundarni poreme aji ponašanja ili dodatne psihijatrijske bolesti) naziva se komorbiditet.

Djeca s poreme ajem pozornosti i hiperaktivnoš u nemaju trajnih prijatelja, esto su izložena neadekvatnim postupcima iz okoline, te esto postaju žrtve razli itih oblika nasilja. Naime, istraživanja su pokazala da se me u takvom djecom nalazi ve i postotak zlostavljane djece u odnosu na op u populaciju, kao i djece koja u adolescentnoj dobi konzumiraju drogu i alkohol. Takvi rezultati pokazuju da djeca s ADHD poreme ajem

imaju definiranu budućnost u kojoj dolazi do značajnog narušavanja socijalnog, akademskog i radnog funkcioniranja (Kocijan-Hecigonja i Karlović, 1999).

1.3 UZROCI POREME AJA

Do uzroci poremećaja pažnje s hiperaktivnošću nisu potpuno poznati, no prema različitim istraživanjima i teorijama uzroci se nalaze na području:

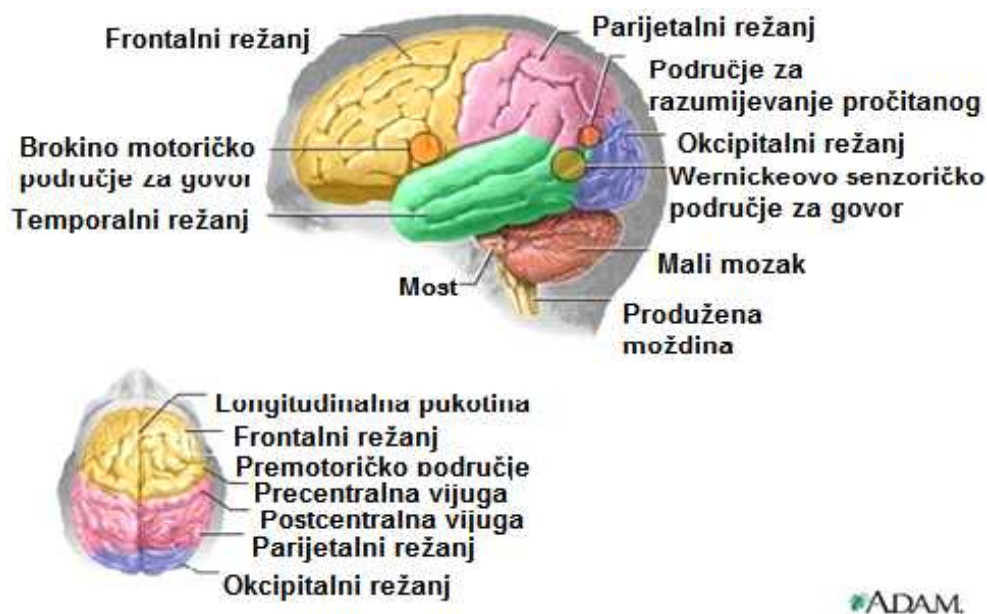
- nasljeđivanje
- poremećaj funkcioniranja mozga
- neurobioloških poremećaja
- socijalnih poremećaja
- patologije obiteljskih odnosa
- emocionalnih problema

U mnogim slučajevima veliku ulogu ima upravo genetsko nasljeđivanje.

Otkriveno je da se poremećaj ponavlja unutar obitelji, te da je rođaci onih koji imaju ADHD u 25% slučajeva također razviti ADHD. Neki stručnjaci smatraju da je uzrok ADHD genetsko nasljeđivanje, iako još nije pronađen odgovarajući gen odnosno geni koji bi mogli biti uzrokom ADHD-a (Rothenberger i sur., 2004; Biederman, 2005).

Prema novijim istraživanjima ADHD ima biološku osnovu, i to oštećenje mozga ili poremećaj u razvoju mozga. Posebno su zahvaćeni frontalni režnjevi tj. centri koji su odgovorni za samokontrolu, inhibiciju ponašanja i ustrajnost.

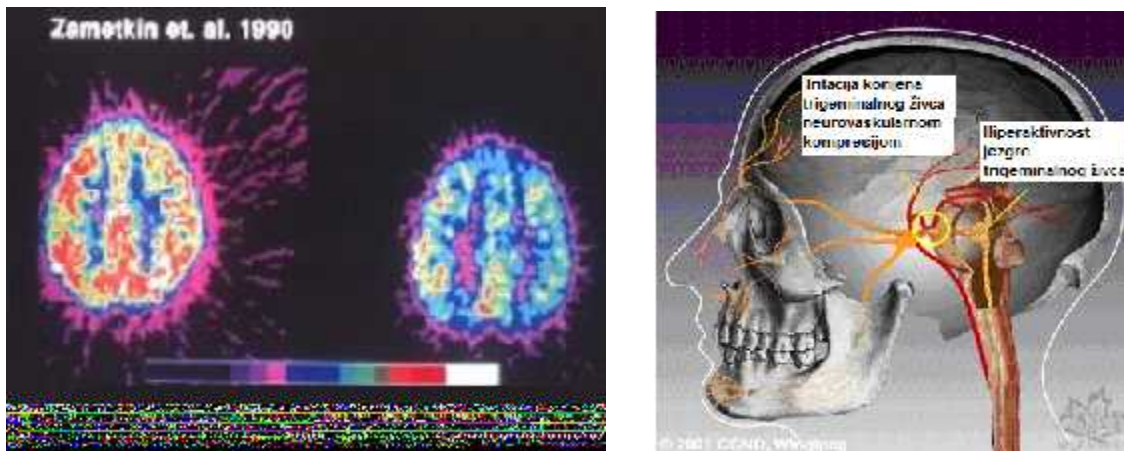
Često se javlja asimetrija između lijevog i desnog dijela frontalnog režnja, kao i abnormalnosti u području talamusa, retikularne supstancije i u limbicnom sustavu (Kocijan-Hecigonja i sur., 2006).



Slika 1.4. Ljudski mozak / slika preuzeta iz www.trustyguides.com/adhd2.html

Osim oštećenja mozga, nekoliko drugih bioloških čimbenika može biti uzrokom ADHD (Biederman, 2005). To su otrovanje olovom, pušenje u trudnoći i, alkoholizam u trudnoći, niska porođajna težina, štetni aditivi u hrani, i drugo. Uz to se najčešće kao uzroci ADHD spominju komplikacije pri porodu (toksemije, eklampsije, loše zdravlje majke, starija dob, poremećeno fetalno sazrijevanje, produženo trajanje poroda, fetalni distress, smanjena porođajna težina, postporođajno krvarenje).

Simptomi ADHD su povezani s kemijskom neravnotežom u mozgu. Upravo su emocije, memorija i socijalna interakcija koordinirani kroz složen sustav neurona koji komuniciraju koriste i kemijske signale koje oslobađaju tvari ili prenositelji koji se nazivaju neurotransmitorima. Poznati neurotransmitori su epinefrin ili adrenalin, norepinefrin ili noradrenalin, dopamin, serotonin i drugi. Kod ADHD poremećaja javlja se neravnoteža neurotransmitora (osobito noradrenalina, dopamina i serotonina) u dijelovima mozga koji kontroliraju misli i ponašanje, kao što su razlikovanje dobro od lošeg i razumijevanje posljedica vlastitog ponašanja (Pattij i Vanderschuren, 2008).



Slika 1.5. PET skeniranje prikazuje mozak ADHD pacijenta (desno) koji je manje aktivan u prednjim dijelovima od mozga pacijenta bez ADHD (lijevo) / slika preuzeta iz www.trustyguides.com/adhd2.html

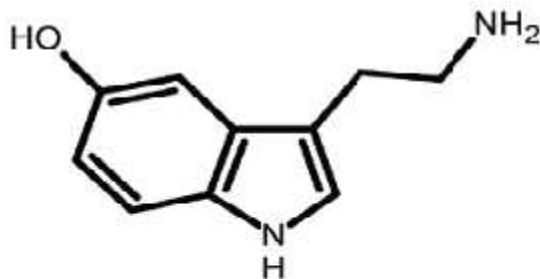
Uzrok pojavljivanja ADHD može biti i konzumiranje droga ili alkohola u trudno i ili kod djece, neki drugi problemi za vrijeme maj ine trudno e, poro ajna trauma, zlostavljanje u djetinstvu, ozljede mozga kao posljedice nesre e, meningitis, encefalitis, ili neki psihološki poreme aj.

Smatra se da bolest nije potpuno nasljedna, ve je vjerovatnije da se ADHD razvije kad se geneti ke predispozicije pomiješaju sa skupom okolišnih imbenika.

1.4 SEROTONIN

Serotonin (5-HT, 5-hidroksitriptamin) je heterocikli ki monoamin koji je poznat kao spoj koji uzrokuje kontrakciju glatkih miši a crijeva (Erspamer i Asero, 1952). Taj monoamin sudjeluje i u regulaciji temperature, apetita, osje aja boli, spolne aktivnosti, ponašanja, krvnog tlaka i disanja.

Serotonin je biogeni amin koji je široko rasprostranjen u prirodi. Prisutan je i u biljnome i životinjskome svijetu, pa se dosljedno tome može unositi u organizam. Ima ga u različitim plodovima (banane, ananas, orasi), u oktopodima (lignje, sipe i hobotnice) te u otrovu osa i škorpiona (Bulat i sur., 1999). Najveći dio 5-HT (95%) u sisavaca stvara se u enterokromafinim (Kultschitzkyjevim) stanicama crijeva. Serotonin se nalazi i u neuronima središnjeg živčanog sustava, pinealnoj žlijezdi i trombocitima (Kema i sur., 2000).



Serotonin - 5-Hidroksitriptamin ($C_{10}H_{12}N_2O$)

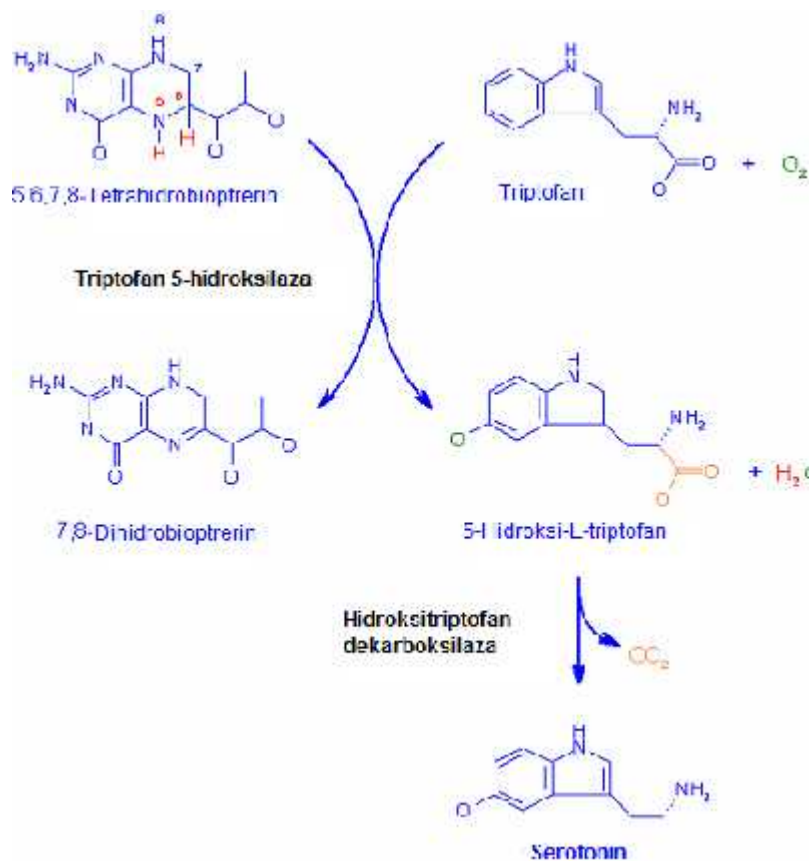
Slika 1.6. Kemijska struktura serotonina
/slika preuzeta iz www.erowid.org/chemicals/other/images/archive/serotonin_2d.gif

Po kemijskom sastavu 5-HT je jednostavna molekula koja ima jednu amino skupinu i upravo zbog toga se klasificira kao monoamin. Serotonin je indolamin i to 3-(2-aminoetil) – 5-hidroksiindol jer sadrži hidroksilnu skupinu (-OH) koja je vezana na peti C atom.

1.5 METABOLIZAM SEROTONINA

Sinteza 5-HT se dešava u središnjem živčanom sustavu, a na periferiji u enterokromafinim stanicama crijeva, pinealnoj žlijezdi, bronhima, štitnjači, gušterači i kralježničnoj moždini. Serotoninski neuroni središnjeg živčanog sustava okupljeni su u jezgama rafe koji se nalaze u moždanom deblu (Kema i sur., 2000). Serotonin u mozgu ima ulogu neurotransmitora i neuromodulatora, dok je na periferiji uključen u nadzor niza fizioloških funkcija.

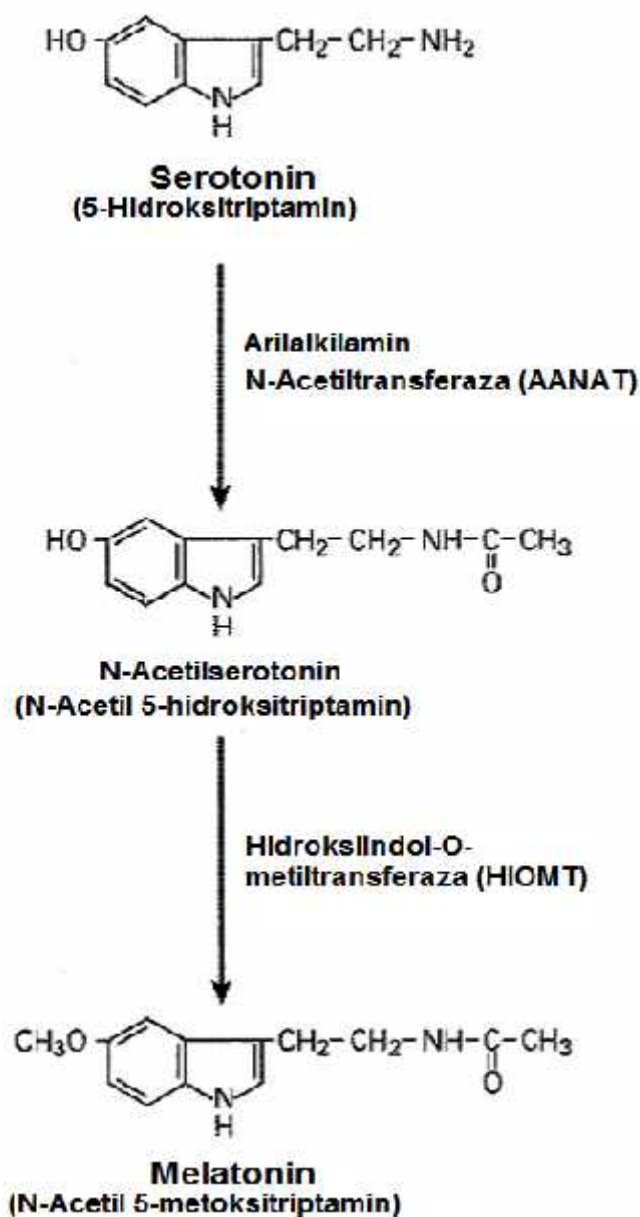
Serotonin je biogeni amin koji nastaje sintezom iz esencijalne aminokiseline triptofana. Enzim triptofan- hidroksilaza (TRH) pretvara L-triptofan u 5-hidroksitriptofan procesom hidroksilacije. Triptofan- hidroksilaza je jedini enzim koji je specifičan za sintezu 5-HT. Prilikom hidroksilacije kofaktori su kisik i tetrahidrobiopterin i u tom se procesu jedan atom kisika ugrađuje u 5-HTP, a drugi reducira do vode. Tetrahidrobiopterin služi kao donor protona i izlazi iz reakcije kao dihidrobiopterin. 5-hidroksitriptofan se tada dekarboksilira uz pomoć enzima triptofan-dekarboksilaze koji je ovisan o piroksil-fosfatu (PLP).



Slika 1.7. Sinteza serotonina

/ slika preuzeta iz www.med.unibs.it/~marchesi/serotonin_synth.gif

Razgradnja 5-HT ide preko enzima MAO (monoaminooksidaze) i stvara se glavni metabolit 5-hidroksiindolactena kiselina, koja je glavni produkt razgradnje 5-HT-a u mozgu, a izlučuje se mokraćom. Iz 5-HT u pinealnoj žlijezdi nastaje melatonin.

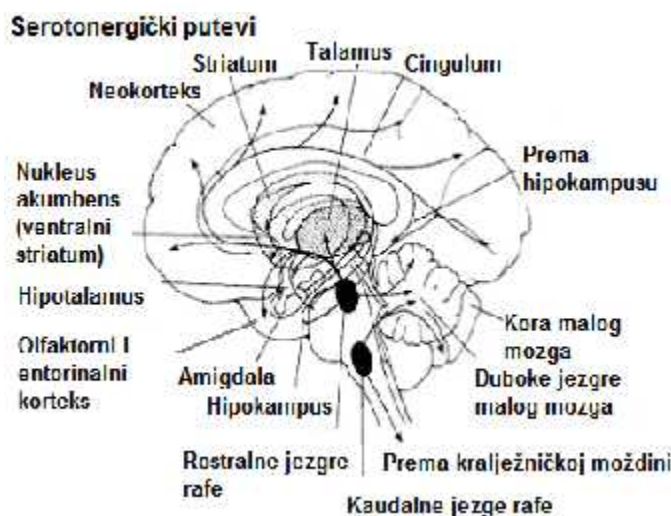


Slika 1.8. Nastanak melatonina iz serotonina / slika preuzeta iz www.biochemsoctrans.org/bst/030/0365/bst0300365a01.gif

1.6 SREDIŠNJI I PERIFERNI SEROTONIN

Serotoninsku homeostazu kod sisavaca možemo promatrati kroz dva metaboli ki odvojena odjeljka. Prvi odjeljak je središnji i obuhvaća središnji živani sustav, a drugi je periferni koji se odnosi na druga tkiva. Središnji i periferni odjeljci su odvojeni krvno-moždanom barijerom koja je nepropusna za 5-HT, ali je propusna za 5-HT prekursor triptofan i metabolit 5-hidroksiindolooctenu kiselinu (Artigas i sur., 1985; Fuller, 1986; Ortiz i sur., 1988).

Serotoninski neuroni u središnjem živanom sustavu okupljeni su u jezgrama rafe koje su smještene u moždanom deblu. Svaka od tih jezgara daje projekcije u određene dijelove mozga, a najznačajnija je projekcija u neokorteks. Projekcije dijelom odlaze i u kralježničku moždinu.



Slika 1.9. Serotonergički putevi u mozgu / slika preuzeta iz www.wellspringchiro.com/ws3_serotonin

Za periferni 5-HT iznimno su važne enterokromafine stanice gastrointestinalne sluznice koje sintetiziraju i otpuštaju dio 5-HT u krvotok. Na taj način 5-HT dopijeva putem krvi do trombocita (Wade i sur., 1996).

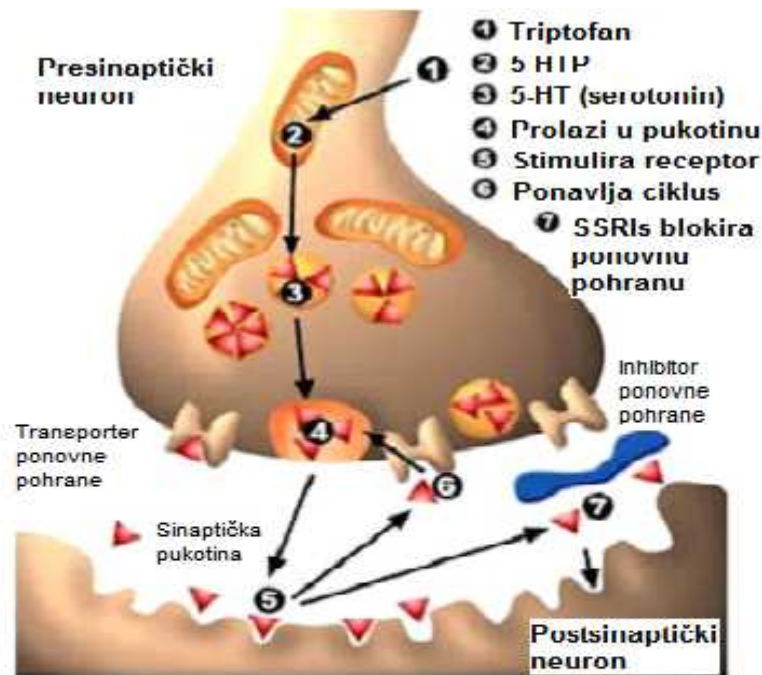
Središnji uinci 5-HT moduliraju raspoloženje (dakle afektivnost), reguliraju san, prijenos i osjet boli, seksualno ponašanje, hranjenje, endokrine funkcije (stimulacija sekrecije prolaktina, ACTH), krvni tlak i dr. (Sandler i sur., 1981; Hervig i sur., 1996; Trimble, 1996; Lucki, 1998; Stahl, 1998).

Periferni uinci 5-HT su važni za regulaciju zgrušavanja krvi, te u upalnim reakcijama. Serotonin izravno utječe na kontrakciju glatkih mišića, i stimulira peristaltiku crijeva.

Poremećaji mehanizama koji održavaju serotoninску homeostazu mogu biti vezani uz različite somatske i duševne bolesti kao što su depresija, shizofrenija, psihoza, ovisnosti, prisilno obuzeti poremećaji, anoreksija, bulimija, migrene i druge (Trimble, 1996; Lucki, 1998; Stahl, 1998). Serotonin također ima važnu ulogu u procesima učenja, pažnje, pamćenja (Mattson i sur., 2004; Van Praag, 2004).

1.7 SEROTONIN KAO NEUROTRANSMITOR

Neurotransmitori su signalne molekule koje se sintetiziraju u presinaptičkim neuronima iz svojih prekursora pomoću enzima koji sudjeluju u toj sintezi. Te kemijske tvari služe za prijenos signala sljedećoj inerviranoj stanici. Molekule neurotransmitora se nalaze pohranjene u mjehurićima (presinaptičke vezikule) u presinaptičkom neuronu. Kada je neuron aktivan, mali električni potencijal se širi duž njegove membrane, dopiće do presinaptičkog završetka i potiče pražnjenje vezikula u sinaptičku pukotinu. Molekule neurotransmitora zatim stupaju u interakciju sa molekulama na površini ciljnog neurona koje selektivno i specifično prepoznaju. Takve receptivne molekule nazivaju se receptori. Vezanjem za receptor neurotransmitor aktivira ciljni neuron, tj. prenosi informaciju. Kemijska signalizacija temelji se na četiri ključna procesa: sintezi, uskladištenju, vezanju za receptore i brzom uklanjanju molekula neurotransmitora iz sinaptičke pukotine.



Schematska ilustracija pretvorbe 5-HTP-a u serotonin i SSRIs mehanizma.

1: Triptofan ulazi u sustav. **2:** Pretvara se u 5-HTP. **3:** 5-HTP se pretvara u 5-HT (serotonin). **4:** Serotonin prolazi kroz membranu u sinaptičku pukotinu. **5:** 5-HT stimulira receptor. **6:** 5-HT spojen s transporterom ponovne pohrane ponovno ulazi u ciklus. **7:** Inhibitori ponovne pohrane povećavaju nivo 5-HT-a u sinaptičkoj pukotini inhibirajući ponovnu pohranu serotoninu pomoću presinaptičkog neurona SSRIs= selektivni inhibitor ponovne pohrane serotoninu.

Slika 1.10. Shema serotonergične sinapse/slika preuzeta iz www.vrp.com/grapics/ADDADHDFig1.jpg

Serotonin djeluje kao neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu. Može djelovati kao ekscitacijski ili inhibicijski neurotransmiter. Serotonergički neuroni sintetiziraju 5-HT iz triptofana koji putuje duž aksona. Serotonin se može nalaziti u mjehuri ili u citoplazmatskom odjeljku. U oba slučaja 5-HT je vezan za specifični protein SBP (prema engleskom "serotonin binding protein") i ta vezana forma sprema enzim monoaminooksidazu (MAO) da ga razgradi. Akcijski potencijal koji prolazi duž aksona i uzrokuje ulazak kalcija u stanicu, dovodi do vezanja mjehurića za staničnu membranu. Sadržaj se otpusti egzocitozom, a najvažnije količina 5-HT se vraća natrag aktivnim unosom.

1.8 SEROTONINSKI RECEPTORI

Serotonin je neurotransmiter koji djeluje u interakciji sa svojim specifičnim receptorima. Do danas je poznato sedam različitih receptora: 5HT₁, 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆, i 5HT₇.

Skupina 5HT₁ je skupina receptora unutar koje postoji pet podtipova: 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1E}, i 5HT_{1F}. Skupina receptora 5HT₂ se odlikuje podskupinama 5HT_{2A}, 5HT_{2B}, i 5HT_{2C}. Većina receptora vezana je za G-proteine koji utječu na aktivnost adenilat-ciklaze ili fosfolipaze. Dio receptora vezanih za G-proteine su G_s (stimuliraju i G protein) i G_i (inhibiraju i G protein). Skupina 5HT₃ je značajna po tome što su joj receptori vezani za ionske kanale. Vezanjem 5-HT-a za 5HT₃ receptore, dolazi do otvaranja natrijevih kanala i ulaska natrija u stanicu nakon čega dolazi do depolarizacije postsinaptičke stanice ili inicijalizacije akcijskog potencijala.

S obzirom na smještaj neki 5-HT receptori su presinaptički, a neki postsinaptički. 5HT_{2A} receptori su odgovorni za agregaciju trombocita i kontrakcije glatkih mišića, dok su za nadzor uzimanja hrane i apetita odgovorni 5HT_{2C} receptori. U gastrointestinalnom traktu nalaze se 5HT₃ receptori koji utječu na podražaj povraćanja i 5HT₄ receptori koji imaju veliku ulogu u regulaciji peristaltike i sekrecije. U limbikom sustavu su smješteni receptori 5HT₆, i 5HT₇ skupine. Inaktivacija 5-HT se događa u neuronima i glia stanicama, a kao produkt nastaje 5-HIAA.

1.9 SEROTONIN I PONAŠANJE

Serotonin je neurotransmiter koji je važan u nadzoru raznovrsnih ponašanja (Lucki, 1998; Stahl, 1998) koja su promijenjena u različitim poremećajima ličnosti i psihijatrijskim poremećajima (Coccaro i sur., 1996; Schmidt i sur., 1997; Twitchell i sur., 1998; Soloff i sur., 2000; Moeller i Dougherty, 2001). Serotonin također utječe na kognitivne funkcije, pa su promjene u serotoninском sustavu povezane s kognitivnim poremećajima, oštećenjima pamćenja, a posebice s povećanjem agresivnosti (Goveas i

sur., 2004). Smatra se da je 5-HT također važan za razvoj suicidalnog ponašanja (Mann, 1998; Mann, 2002; Mann, 2003). Suicidalno ponašanje često se javlja u različitim psihijatrijskim bolestima koja su povezana sa smanjenim funkcioniranjem serotoninskog sustava (Dubovsky i Thomas, 1995; Mueller-Oerlinghausen i sur., 2004). Pretpostavlja se da 5-HT također sudjeluje u nadzoru antisocijalnog i agresivnog ponašanja (Popova, 2006). Naime osobe koje pokazuju antisocijalno i agresivno ponašanje imaju sniženu koncentraciju 5-HT u usporedbi s neagresivnim pojedincima (Coccaro i sur., 1989).

1.10 SEROTONIN I ADHD

Iako neurobiološka podloga ADHD nije u potpunosti objašnjena, pretpostavlja se da su za etiologiju odnosno nastanak ADHD odgovorne promjene u funkcioniranju dopaminergičkog i noradrenergičkog sustava (Zametkin i Rapoport, 1987; Pliszka i sur., 1988; Biederman, 2005).

Pretpostavlja se da je poremećena funkcija dopaminergičkog sustava odgovorna za nastanak ADHD. Brojne teorije su pretpostavile povezanost dopaminergičkih puteva u mozgu s pažnjom i funkcijama koje su promijenjene u ADHD. Povezanost dopamina s ADHD proizlazi iz činjenice da tvari koje djeluju na taj način povećavaju aktivnost dopamina poput amfetamina ili metilfenidata pojačavaju simptome ADHD (DiMaio i sur., 2003). Jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija (SPECT) pokazuje abnormalnosti u neuroanatomskim područjima bogatim dopaminergičkom inervacijom u djece s ADHD. Povećanjem dopaminergičke aktivnosti u nukleusu akumbensu potiče se i impulzivnost.

Noradrenergički sustav je blisko povezan s višim kortikalnim funkcijama kao što su pažnja, pozornost, oprez i izvršne funkcije. Disfunkcije u frontalno-kortikalnim putevima koje se javljaju u osoba s ADHD, povezane su sa poremećajem regulacije noradrenergičke funkcije. Poremećaji u regulaciji središnje noradrenergičke mreže čine podlogu patofiziologije ADHD (Arnsten i sur., 1996; Pliszka i sur., 1996). Hiperaktivnost

u ADHD je uzrokovana povećanjem središnjeg noradrenergičkog prijenosa (Kornetsky, 1970).

Osim navedenih neurotransmitora, radi kognitivnih promjena i oštećenja koja su karakteristična za ADHD, smatra se da važnu ulogu u nastanku ADHD ima i serotonergički sustav (Comings, 2001; Rothenberger i sur., 2004). Serotonergički sustav utječe na procese učenja i pamćenja (Van Praag 2004; Schmitt i sur., 2006), a uz to nadzire patološka ponašanja kao što je ekstremno nasilništvo, neprijateljstvo, impulzivnost i agresiju (Sarnecki i sur., 1995; Askenazy i sur., 2000; Dolan i sur., 2002; Goveas i sur., 2004), a to su sve procesi i ponašanja koja su promijenjena u ADHD.



Slika 1.11. Preklapanje funkcija i ponašanja koja su posredovana serotoninom, dopaminom i noradrenalinom /
slika preuzeta iz www.deplin.com/template/img/content_neurochar

Vezu između poremećaja dopaminergičkog sustava i ADHD se može pokazati neizravno, putem istraživanja napravljenih na eksperimentalnim životinjama. Iako ne

postoji animalni model za ADHD, hiperkativnost se u životinja može izazvati na različite načine. U eksperimentalnih životinja, pri čemu su ženke bile izložene nikotinu tj. dimu cigareta, pokazano je da u njihovom leglu postoji pozitivna korelacija između hiperkativnosti i izlaganja nikotinu za vrijeme graviditeta (Fung i Lau, 1989; Van De Kamp i Collins, 1994; Thomas i sur., 2000).

1.11 TROMBOCITNI SEROTONIN

Trombociti su krvne pločice tj. malena bezbojna tjelešca bez jezgre. Imaju važnu ulogu u procesu zgrušavanja krvi jer je održavanje krvi u tekućem stanju unutar krvotoka i zaustavljanje krvarenja pri oštećenju krvnih žila važan mehanizam za očuvanje homeostaze organizma.

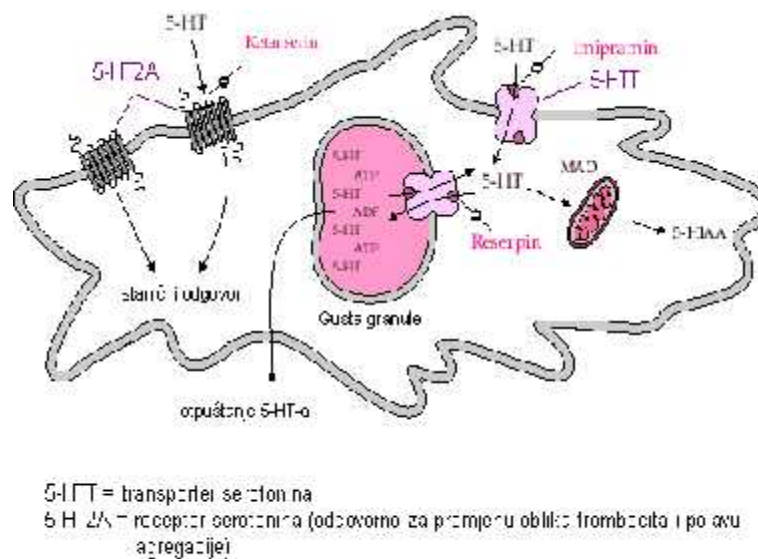
Krvne pločice nastaju u koštanoj srži pri čemu se izmatiraju stanice megakarioblasta razvijaju promegakariociti, a zatim megakariociti koji su također i najveće stanice u koštanoj srži. Sazrijevanjem megakariocita i fragmentiranjem njihove citoplazme u koštanoj srži nastaju trombociti koji su najmanje cirkulirajuće krvne stanice. U cirkulirajućoj krvi nalaze se isključivo trombociti čiji životni vijek traje 7-10 dana.

Trombociti su diskoidalnog oblika promjera 2-4 µm, ne sadrže jezgru, endoplazmatski retikulum ni Golgijev aparat. Sastoje se od periferne zone (membrana, glikokaliks i otvoreni kanalizirani sustav), strukturalne zone (mikrofilamenti i mikrotubuli) i organela (lizosomi, mitohondriji, glikogeni, gusti tubularni sustav, gusta tjelešca, A-granule alfa). Trombociti su okruženi omotačem koji sadrži glikoproteine, uključujući i intergrine, koji su ključni za adheziju i agregaciju. Adhezija je proces kod kojeg se prilikom oštećenja endotela krvnih žila na bazalnu membranu lijepe trombociti. Agregacija je proces pri kojem se na mjestu oštećenja krvne žile nakupljaju trombociti tvoreći trombocitni ugrušak. Ispod omotača nalazi se plazmatska membrana s invaginacijama koje povećavaju dostupnu površinu za adsorpciju koagulacijskih proteina. Citoskelet je izgrađen od brojnih aktinskih filamenata koji su međusobno povezani. Zadaća citoskeleta je izgradnja i održavanje diskoidalne strukture trombocita. U

unutrašnjosti trombocita (citoplazmi) nalaze se alfa granule i guste granule. Najviše ima alfa granula koje sadrže glikoproteine, imbenik rasta trombocita, fibrinogen i druge imbenike zgrušavanja. Guste (delta) granule sadrže ione kalcija, serotonin, ATP i ADP potreban za agregaciju trombocita. Delta granule otpuštaju svoj sadržaj nakon adhezije trombocita.

Uz 5-HT neurone i enterokromafine stanice, trombociti spadaju u stanice najbogatije serotoninom. Iako se trombociti anatomski, funkcionalno i ontogenetski razlikuju od živ anih stanica, elementi trombocitnog serotoniniskog sustava su gotovo identični onima u serotoninergičnim neuronima. Sličnosti između neurona i trombocita postoje u sličnom unosu 5-HT-a u trombocite odnosno u ponovnom unosu u neurone, sličnim procesima pohrane i otpuštanju 5-HT. Trombociti i neuroni dijele monoamino oksidazu tipa B, 5-HT transportere (Lesch i sur., 1994), 5HT₂ receptore (Andres i sur., 1993), α_2 -adrenergične receptore i vezna mjesta za ³H-imipramin, ³H-paroksetin i ³H-LSD. Razlika je u tome što trombociti nemaju jezgru, ne provode električne impulse, imaju kraći životni vijek i ne sintetiziraju 5-HT (Lesch i sur., 1994). Po podrijetlu trombociti potječu iz mezoderma, a neuroni iz ektoderma.

Trombocitni 5-HT dolazi u trombocite iz crijeva jer trombocit ne posjeduje ključni enzim za sintezu 5-HT, a to je enzim triptofan hidroksilaza. Serotonin se pomoću prijenosnog proteina tj. serotoniniskog prijenosnika ili transportera (SERT ili 5-HTT) unosi u unutrašnjost trombocita (Fuller, 1986). Trombocitni 5-HT sintetizira se u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva. U visokim koncentracijama 5-HT se nalazi u trombocitnoj citoplazmi tj. u gustim zrnima ili delta granulama. One su praktički neprozirne za elektronski snop mikroskopa pa su zato i dobile naziv gusta zrnca. U trombocitima susrećemo elemente serotoniniskog sustava kao što su enzim monoamino oksidaza (MAO-B), serotoniniski receptor, serotoniniski transmembranski prijenosnik (5-HTT) i sam 5-HT koji je pohranjen u gustim zrnima.



Slika 1.12. Shema trombocitnog serotonina

Proces nakupljanja 5-HT u trombocitu ide preko dva prijenosnika. Proteinski 5-HT prijenosnik tj. 5HTT se nalazi na membrani trombocita i posreduje unosu 5-HT iz krvne plazme u unutrašnjost trombocita (Kema i sur., 2000). Za aktivni unos 5-HT u trombocite nije dovoljan samo 5-HTT već i ioni klora i natrij-kalijeve ATP-aze. Energiju osigurava ionski gradijent natrijevih i kalijevih iona. Drugi prijenosnik je vezikularni (nespecifični proteinski) prijenosnik koji se nalazi na membrani gustih (delta) granula. Taj prijenosnik posreduje unos serotonina iz trombocitne citoplazme u delta granule (Pletscher, 1987). Za ovaj drugi stupanj unosa, osim vezikularnog prijenosnika potrebne su i vodikove pumpe i ATP. Serotonin ulazi u granule u zamjenu za vodikove ione koje vodikova ATP-aza ubacuje iz okolne citoplazme. Na membrani trombocita nalazi se i serotoninški receptor 5-HT_{2A} tipa koji nakon vezanja za 5-HT inducira promjenu oblika trombocita i pojačava agregaciju trombocita. Trombociti imaju i sposobnost otpuštanja 5-HT putem egzocitoze. To se događa za vrijeme aktivacije trombocita tijekom procesa zgrušavanja.

Istraživanjem elemenata trombocitnog serotoninškog sustava bave se različite medicinske discipline, ali najveći dio istraživanja provodi se u području neuroznanosti, i

to posebice u području biološke psihijatrije, zbog lake dostupnosti trombocita i elemenata serotoninskog sustava i njihovog korištenja u smislu perifernog modela za analogne sinaptičke strukture (Pletscher, 1968; Stahl, 1985; Da Prada i sur., 1988; Andres i sur., 1993; Hrdina, 1994; Camacho i Dimsdale, 2000). U prilog trombocitnom modelu govori strukturna sličnost modela 5-HTT, 5-HT_{2A} receptora, enzima monoaminooksidaze tipa B u neuronima i trombocitima (Stahl, 1985; Da Prada i sur., 1988; Andres i sur., 1993; Hrdina, 1994). Valjanost trombocitnog modela ograničava odsutnost jezgre u trombocitu i mogućnost različite regulacije transkripcije gena u mozgu i perifernim tkivima (Austin i sur., 1994).

Međutim, budući da je u ispitanika mozak teško dostupan materijal, trombociti se koriste kao lako dostupan ograničeni periferni model za središnje serotonergične neurone, i to upravo zato što i trombociti i serotonergički sinaptosomi dijele slične biokemijske procese (Stahl, 1985; Andres i sur., 1993; Camacho i Dimsdale, 2000; Mueller-Oerlinghausen i sur., 2004).

Treba istaknuti da trombociti, za razliku od neurona, ne mogu sintetizirati 5-HT, već akumuliraju 5-HT koji je bio sintetiziran u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva putem portalnog sustava. Naime, iako postoje metode koje nam mogu dati uvid u procese koji se dešavaju u središnjem živčanom sustavu, kao što su funkcionalne “imaging” tehnike, “jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija” ili (SPECT), «pozitronska emisijska tomografija (PET)», «funkcionalna magnetska rezonancija (fMRI)», «kompjutorska tomografija (CT)» (Wong i Van Tol, 2003), te metode su komplicirane, zahtijevaju skupocjenu opremu i određenu pripremu ispitanika, injiciranje kratkoživućih radioizotopa, te su radi toga nepogodne za znanstvena istraživanja. Radi toga se koriste neurokemijska i genetska istraživanja, koja nam mogu ponuditi uvid u funkcioniranje raznih neurotransmitora kao što je 5-HT. Neurokemijske metode koriste biomarkere, odnosno određene biološke molekule koje se mogu koristiti za preklinička istraživanja, za dijagnostiku, za predviđanje određenih ponašanja te za praćenje terapijskih odgovora.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

ADHD je klinički izrazito heterogeni psihijatrijski poremećaj, uzrokovan interakcijom različitih čimbenika (bioloških, genetskih, okolišnih), koji se često javlja u djece, adolescenciji, a rjeđe i u odraslih. ADHD uzrokuje mnoštvo problema u socijalnom funkcioniranju, odnosima u obitelji i problema u školovanju. ADHD je poremećaj u kojem dominiraju tri karakteristične skupine simptoma: nepažnja, hiperaktivnost i impulzivnost. Uzroci ADHD uključuju nasljedne čimbenike, poremećeno funkcioniranje mozga, neurobiološke čimbenike, socijalne poremećaje, poremećene obiteljske odnose i emocionalne probleme. Neurobiološka podloga ADHD nije potpuno jasna, no smatra se da je sigurno povezana s poremećajima u funkcioniranju raznih neurotransmitorskih sustava kao što su dopamin i noradrenalin. Budući da se kod ADHD često javljaju različiti kognitivni poremećaji i poremećaji pažnje, koncentracije, učenja i pamćenja, pretpostavlja se da i serotonin ima ključnu ulogu u nastanku ADHD. Osim navedenog, djeca koja boluju od ADHD su često agresivna i impulzivna, a i agresija i impulzivnost su ponašanja posredovana prvenstveno serotoninским sustavom. Serotonin ima važnu ulogu u regulaciji različitih fizioloških i patoloških oblika ponašanja i funkcija, procesa učenja i pamćenja, no on i nadzire ekstremna ponašanja kao što su nasilje, neprijateljstvo, impulzivnost i agresiju, a to su sve ponašanja koja su promijenjena u ADHD.

Istraživanje serotoninске funkcije u osoba s ADHD su povezana s raznim metodološkim i etičkim problemima, jer bi za uvid u promjene funkcioniranja serotoninškog sustava u središnjem živčanom sustavu trebalo istražiti mozak ili cerebrospinalnu tekućinu i to pomoću invazivnih, skupih i kompliciranih tehnika. Stoga se u oboljelih od ADHD koriste periferni pokazatelji, a među njima smo mi izabrali periferne serotoninске pokazatelje u trombocitima. Trombociti se koriste kao lako dostupan ograničeni periferni model za središnje serotoninergične neurone jer trombociti i serotoninergički sinaptosomi dijele slične biokemijske procese (Stahl, 1985; Andres i sur., 1993; Camacho i Dimsdale, 2000; Mueller-Oerlinghausen i sur., 2004).

Koncentracija trombocitnog serotonina istraživana je u oboljelih od ADHD, no za sada nema jednoznačnih podataka o tome je li koncentracija trombocitnog 5-HT snižena, povišena ili nepromijenjena u ADHD.

Budući da je pokazano kako je koncentracija trombocitnog 5-HT promijenjena u osoba s agresivnim i impulzivnim ponašanjem, hipoteza ovog rada bila je da će koncentracija trombocitnog 5-HT biti promijenjena u djece s ADHD. Cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju trombocitnog 5-HT u djece s ADHD, i usporediti vrijednosti trombocitnog 5-HT s vrijednostima 5-HT u trombocitima kontrolne zdrave djece. Naime, ako se pretpostavka ovog rada pokaže točnom (a to je da se koncentracija trombocitnog 5-HT razlikuje između u oboljelih od ADHD i odgovarajuće zdrave kontrolne skupine), tada bi se moglo uvesti određivanje jednog lako dostupnog perifernog pokazatelja ADHD, a to je određivanje koncentracije trombocitnog 5-HT, i na taj način pomoći u dijagnostici kliničkim postupcima te bolesti.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 SKUPINE ISPITANIKA

U studiju smo uključili ili 79 djece koja su razvila ADHD koji je bio dijagnosticiran putem Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje, a to je priručnik kojeg je izdalo američko psihijatrijsko društvo 1994. godine. ADHD je bila primarna dijagnoza koja je dijagnosticirana putem strukturiranog kliničkog intervjua, prema kriterijima postavljenim u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, IV revizija (Diagnostic Statistical Manual, DSM-IV, American Psychiatric Association, 1994). Bolesna djeca nisu primala nikakve psihotropne lijekove prije uzimanja krvi. Svi su sudionici studije dali svoj informirani pristanak za sudjelovanje u studiji. ADHD je bio procijenjen pomoću kliničkog intervjua, fizičkog pregledom i putem Conners-ovih skale za roditelje i učitelje (Conners, 1998). Svi su uzorci sakupljeni od djece koja su došla radi smetnji izazvanih ADHD-om u Polikliniku Kocijan/Hercigonja, u Zagrebu. Prof.dr.sc. Dubravka Kocijan Hercigonja, psihijatrica s bogatim iskustvom u psihijatrijskim poremećajima djece i adolescenata, je postavila dijagnozu ADHD pomoću kliničkog intervjua s djecom i posebno sa roditeljima, te dobila potvrdu o pristanku za uzimanje krvi. Roditelji su bili potpuno obaviješteni o cilju studije i aktivno su sudjelovali u studiji. Djeca su bila gradskog porijekla, išla su u vrtiće ili škole i ni jedno dijete nije dolazilo iz razorenih obitelji. Sva su djeca imala oba roditelja. ADHD je kod djece uzrokovalo mnoštvo problema u školi i u socijalnom funkcioniranju. U skupinu djece nisu bila uključena ona djeca koja su bolovala od drugih psihijatrijskih bolesti kao što su komorbidna depresija, shizofrenija, i druge.

Kriteriji za uključivanje u studiju:

- dijagnoza ADHD

Za postavljanje dijagnoze prema DSM IV trebali su biti zadovoljeni određeni kriteriji:

A)

6 ili više od ukupno 9 karakteristika za nepažnju

6 ili više za hiperaktivnost i nepažnju od ukupno 6 za hiperaktivnost i 3 za nepažnju

B)

simptomi su morali nastati prije 7 godine života

C)

oštećenje kao posljedica simptoma javlja se u dvije ili više sredina

D)

jasni znakovi socijalnog, akademskog ili radnog funkcioniranja

E)

ne javljaju se u sklopu nekog drugog poremećaja

Kriteriji za isključivanje iz studije:

- Prijašnja terapija s antidepresivima koji mogu utjecati na koncentraciju trombotičnog 5-HT (Muck Šeler i sur., 2002; Pivac i sur., 2003; Muck Šeler i sur., 2005).

Od 79 djece, 77 nije primalo nikakve lijekove u vrijeme uzimanja krvi, dok su 2 djeteta dobivali karbamazepin.

Kontrolna skupina ispitanika: u kontrolnoj skupini uključeno je 30 zdrave djece, koja su bila odgovarajuća po godinama, i koja nisu patila od psihijatrijskih poremećaja.

Svi su roditelji potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u studiji. Etički odbor je odobrio ova istraživanja.

3.2 ODREĐIVANJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA

Djeci kojoj je dijagnosticiran ADHD uzeta je 4 ml krvi iz kubitalne vene u plastičnu špricu s 1 ml antikoagulansa acid citrat deksroza (ACD). Na sobnoj temperaturi krv se centrifugira na 950 g x 30 s. Dobivena plazma bogata je trombocitima (prema eng. «platelet-rich-plazma (PRP)»). U hladnoj (+ 4°C) centrifugira na 10.000 x g 5 min provodi se daljnje centrifugiranje plazme bogate trombocitima. Rezultat tog centrifugiranja su sedimentirani trombociti. Talog se ispiri fiziološkom otopinom i ponovno centrifugira. Sedimentirani trombociti smrznu se na - 20°C i pohrane prije postupka određivanja koncentracije 5-HT. Trombociti ne smiju biti pohranjeni u zamrzivaču duže od 7 dana.

Koncentracija trombocitnog 5-HT određuje se pomoću spektrofotometrijske metode (Muck-Šeler i sur., 1996; Pivac i sur., 2001). Ukratko, trombociti se razbijaju u sonikatoru (20 kHz, amplituda 8×10^{-3} mm kroz 30 sek). Sonikati trombociti, uzorci standarda i slijepa probe (blank) koju čini deionizirana voda analiziraju se u duplikatu. Svi se uzorci deproteiniziraju s 1 ml 10% ZnSO_4 i 0.5 ml NaOH. U deproteinizirane uzorke za pripremu fluorofora dodaje se 0.2 ml L-cisteina (0.1%) i 1.2 ml ortoftalaldehida (0.05%). Tim postupkom pomaknut je maksimum fluorescencije i ekscitacije na veću valnu duljinu. To je veoma važno jer se tako razlikuje od interferiranja ih spojeva koji fluoresciraju pri istim valnim duljinama. Mjerenje 5-HT fluorescencije provodi se na Varian Cary Eclipse spektrofotometru pri valnim duljinama 345/485, a koncentracija trombocitnih proteina metodom po Lowry-ju (Lowry i sur., 1951).

POSTUPAK ODREĐIVANJA 5-HT: Na talog trombocita doda se 1.5 ml deionizirane vode ($\text{Q H}_2\text{O}$). Dignuti talog se dobro izmiješa u ciklomikseru, a nakon toga uzorak se sonicira u sonikatoru po 30 sekundi. Plastične epruvete se označe, a zatim se u njih dodaje 1.2 ml sonikata ili 1.2 ml standarda ili 1.2 ml deionizirane vode (slijepa proba ili blank). U svaku epruvetu (blank, standard, uzorci) dodaje se 1 ml ZnSO_4 , dobro izmiješa

u ciklomikseru, zatim se dodaje 0.5 ml NaOH (pohranjena na sobnoj temperaturi) i opet se sve izmiješa u ciklomikseru. Nakon što su uzorci odstajali 5 minuta, centrifugiraju se 10 min na 10 000 rpm (Centrifuga Sorwall, na + 4°C). Iznad taloga nalazi se supernatant od kojeg uzmemo po 2 ml u staklene duga ke epruvete. Na supernatant dodaje se 0.2 ml L-cisteina (0.1 % otopina u 0.1 N HCl), 1 ml OPT (0.05% otopina u 10 N HCl) i kuha 10 minuta u kipu oj vodi (100°C). O itavanje se vrši na Varian Cary Eclipse spektrofleurimetru pri valnim duljinama 345 nm / 485 nm.

PRIPREMA STANDARDA: mati na (stock) otopina sadrži :

0.1 ml + 9.9 ml Q H₂O 2000 ng/ml

2.5 ml + 7.5 ml Q H₂O 500 ng/ml

4 + 4 = 250 ng/ml

3 + 3 = 125 ng/ml

2 + 2 = 63 ng/ml

POSTUPAK:

PRIPREMENJE OTOPINA:

- | | |
|---|--|
| ➤ 1.5 ml Q H ₂ O | 10% ZnSO ₄ 5 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O u 50 ml QH ₂ O |
| ➤ soniciranje | |
| ➤ 1.2 ml sonikata | 1 N NaOH 4 g NaOH u 10 ml QH ₂ O |
| ➤ 1.0 ml ZnSO ₄ | |
| ➤ 0.5 ml NaOH | 0.1 % L-cistein 10 mg cisteina u 10 mg |
| ➤ 5' stoji | 0.1 N HCl |
| ➤ 10' 1000 rpm | |
| ➤ 2.0 ml supernatanta | 0.05% OPT u 50 ml 10 N HCl otopi se |
| ➤ 0.2 ml L-cistein | 25 mg OPT-a |
| ➤ 1.0 ml OPT | |
| ➤ 10' kuhati u H ₂ O (100°C) | |
| ➤ mjerenje 345 nm / 485 nm | |

3.3 ODREĐIVANJE PROTEINA (po Lowryju)

Standardi:

0.2 ml stocka + 0.2 ml 0.1 N HCl (25 µg)

0.2 ml + 0.2 ml 0.1 N HCl (12.5 µg)

0.2 ml + 0.2 ml 0.1 N HCl (6.25 µg)

ABC smjesa:

100 ml Na₂CO₃

1 ml CuSO₄ (2)

1 ml K-Na-tartarat (1)

POSTUPAK:

U svaku epruvetu se stavi 10 µl uzorka, a na to se doda 2 ml ABC smjese. Smjesa se ostavi stajati 10 minuta, a zatim se doda 0.2 ml folina (1:1). Nakon 30 minuta spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 700 nm.

3.4 TEHNIKA POMAGALA

Varian Cary Eclipse spectrofluorimetar

Elektronska vaga (PB 3002-S Delta range, Mettler – Toledo)

Centrifuge (5804 R Eppendorf, MiniSpin Eppendorf)

Vortex mješalica (Heidolph)

Hladnjak (- 4°C)

Zamrziva (- 20°C)

Magnetska mješalica (Heidolph)

3.5 STATISTI KA OBRADA PODATAKA

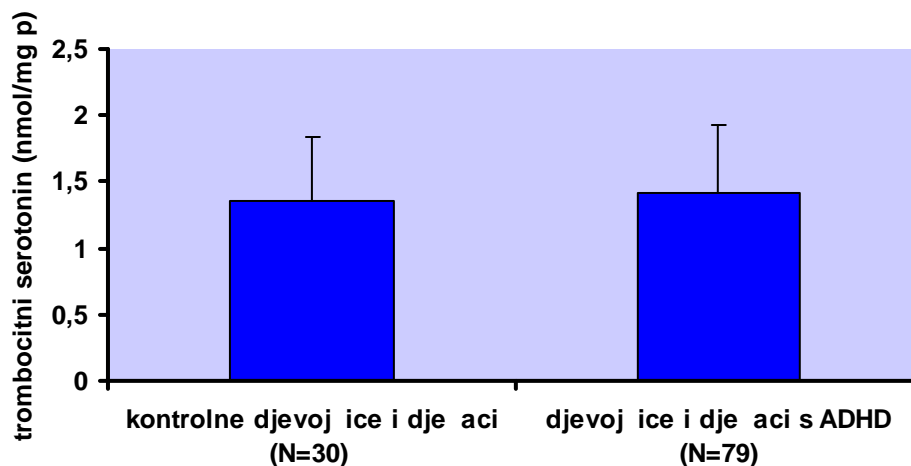
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Statisti ka obrada dobivenih podataka napravljena je pomo u jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je za usporedbu izme u pojedina nih skupina korišten Student Newman Keuls test multiple komparacije podataka. Korelacija izme u pojedinih parametara odre ena je pomo u Pearsonovog koeficijenta korelacije. Zna ajnost rezultata je prihva ena kod $p < 0.05$. Statisti ka analiza podataka je provedena pomo u statisti kog programa Sigmastat 2.0 (Jandell scientific Corp., San Raphael, California, SAD).

4 REZULTATI

4.1 KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJECE S ADHD I U KONTROLNE DJECE

Slika 1. prikazuje koncentraciju trombocitnog 5-HT u djece s ADHD i u kontrolne djece. Koncentracija trombocitnog 5-HT nije se razlikovala izme u skupina djece s ADHD i kontrolne djece. Naime, jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) je pokazala kako nema zna ajne ($F=0.264$; $df=1,107$; $p=0.609$) razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT izme u djece s ADHD i kontrolne djece.

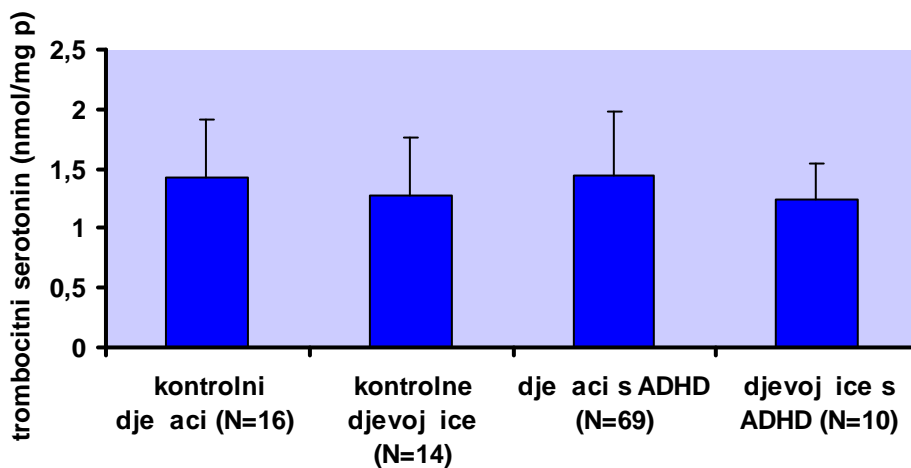
Slika 4.1. Koncentracija trombocitnog serotonina u djece s ADHD i u kontrolne djece



4.2 KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJE AKA I DJEVOJ ICA S ADHD I U KONTROLNIH DJE AKA I DJEVOJ ICA

Koncentracija trombocitnog 5-HT u dječaka i djevojčica s ADHD i u kontrolnih dječaka i djevojčica prikazana je na slici 2. Kad su djeca bila podijeljena prema spolu, koncentracija trombocitnog 5-HT nije se razlikovala između dječaka i djevojčica s ADHD i kontrolnih dječaka i djevojčica. Jednosmjerna ANOVA je pokazala kako nema značajne ($F=0.745$; $df=3,105$; $p=0.528$) razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između dječaka i djevojčica s ADHD i u kontrolnih dječaka i djevojčica.

Slika 4. 2. Koncentracija trombocitnog serotonina u dječaka i djevojčica s ADHD i kontrolnih dječaka i djevojčica

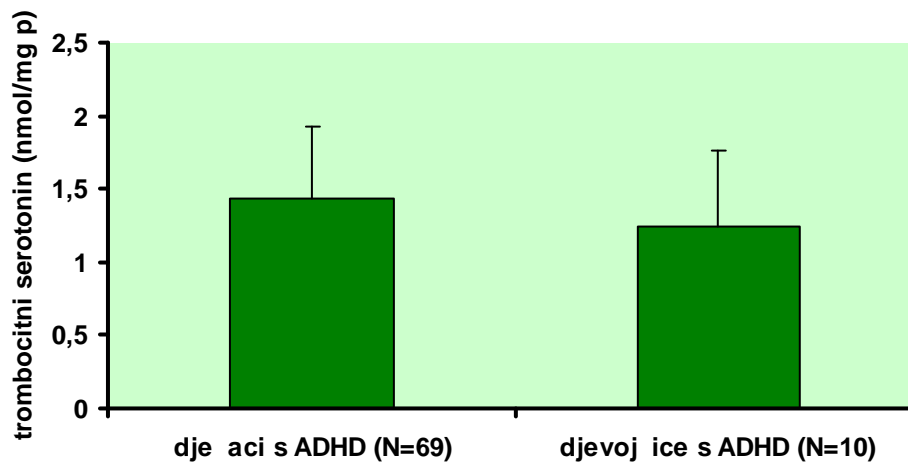


4.3 KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJEČACIMA I DJEVOJČICAMA S ADHD

U odraslih osoba postoji spolom izazvana razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između muških i ženskih ispitanika. Kako se u ovom istraživanju činilo da postoji određena razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između dječaka i djevojčica, dakle razlike koje su uzrokovane spolom ispitanika, izmjerili smo koncentraciju trombocitnog 5-HT u dječacima i djevojčicama s ADHD i te su vrijednosti prikazane na slici 3. Kad su djeca bila podijeljena prema spolu, koncentracija trombocitnog 5-HT nije se razlikovala unutar djece s ADHD tj. između dječaka i djevojčica s ADHD. Jednosmjerna ANOVA je

pokazala kako nema značajne ($F=1.248$; $df=1,77$; $p=0.267$) razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između dječaka i djevojčica s ADHD.

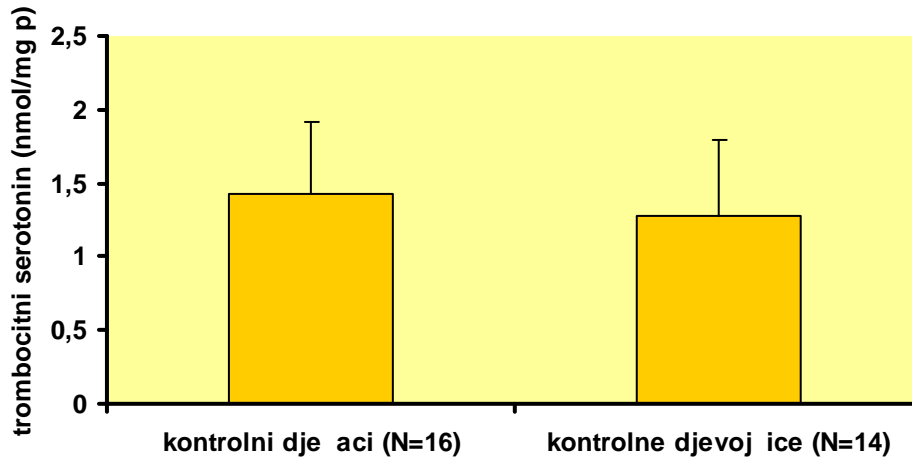
Slika 4.3. Koncentracija trombocitnog serotonina u dječaka i djevojčica s ADHD



4.4 KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U KONTROLNIH DJEČAKA I DJEVOJČICA

Također smo željeli istražiti postoji li razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između kontrolnih zdravih dječaka i djevojčica. Kako bi odredili moguće razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT koje su uzrokovane spolom ispitanika, izmjerili smo koncentraciju trombocitnog 5-HT u kontrolnim ispitanicima, dakle u kontrolnim dječacima i djevojčicama. Slika 4. prikazuje koncentraciju trombocitnog 5-HT u kontrolnim dječacima i djevojčicama. Nije bilo razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između kontrolnih dječaka i djevojčica. Jednosmjerna ANOVA je pokazala kako nema značajne ($F=0.751$; $df=1,28$; $p=0.393$) razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između kontrolnih dječaka i djevojčica.

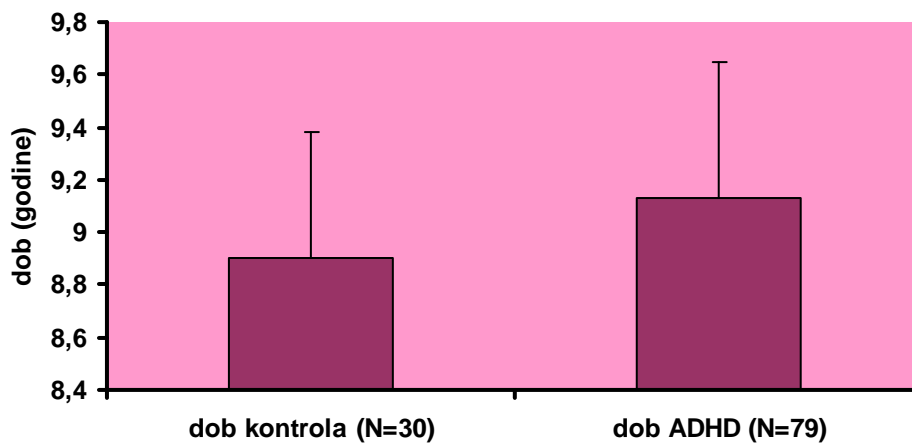
Slika 4.4. Koncentracija trombocitnog serotonina u kontrolnih dječaka i djevojčica



4.5 GODINE ŽIVOTA (DOB) U DJECE S ADHD I U KONTROLNE DJECE

Slika 5. prikazuje dob u djece s ADHD i u kontrolne djece. Ima u skupina djece s ADHD i kontrolne djece nije bilo razlike u dobi (prikazane u godinama života). Naime, jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) je pokazala kako nema značajne ($F=0.187$; $df=1,107$; $p=0.666$) razlike u starosti između djece s ADHD i kontrolne djece.

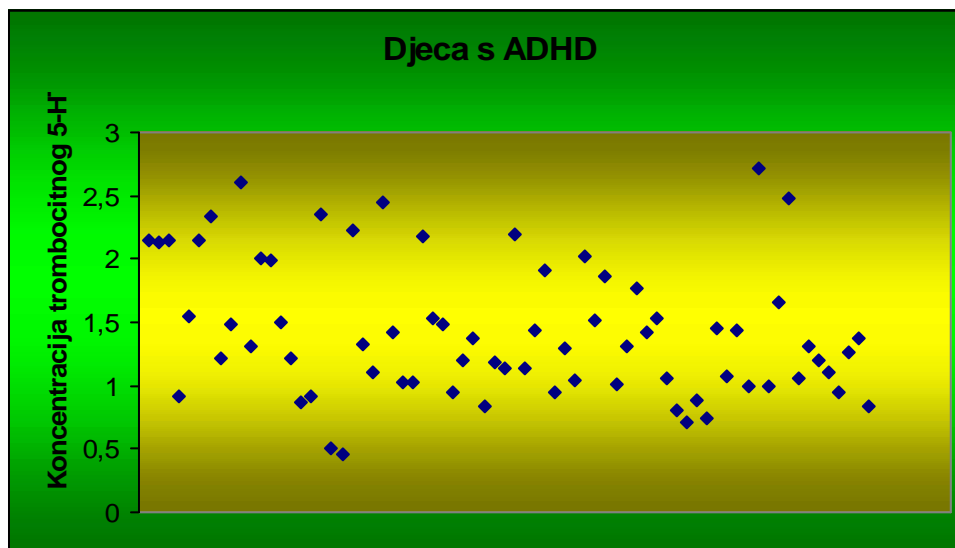
Slika 4.5. Godine života(dob) u djece s ADHD i u kontrolne djece



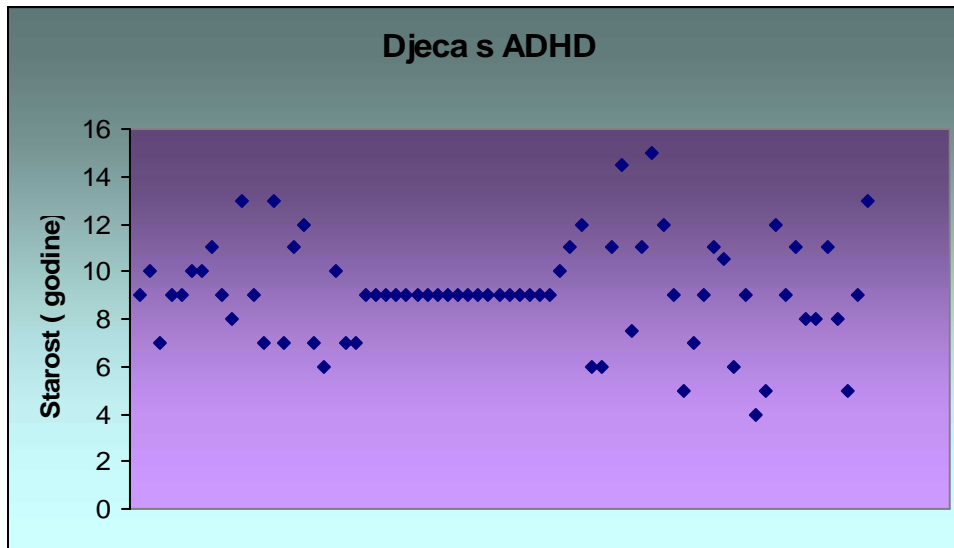
4.6 KORELACIJA IZME U DOBI I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJECE S ADHD

Tako er smo željeli istražiti postoji li korelacija (povezanost) izme u koncentracije trombocitnog 5-HT i dobi kod djece s ADHD. Tu smo korelaciju odredili pomo u Pearsonovog koeficijenta korelacije. Slika 6. prikazuje individualne vrijednosti za trombocitni 5-HT u djece s ADHD, dok slika 7. prikazuje individualne vrijednosti za dob u djece s ADHD. Nije bilo zna ajne korelacije izme u koncentracije trombocitnog 5-HT i dobi kod djece s ADHD. Pearsonov test korelacije pokazao je da ne postoji zna ajna ($r=-0.143$; $p=0.230$) povezanost (korelacija) izme u koncentracije trombocitnog 5-HT i dobi kod djece s ADHD.

Slika 4.6. Individualni podaci za vrijednosti trombocitnog serotonina u djece s ADHD



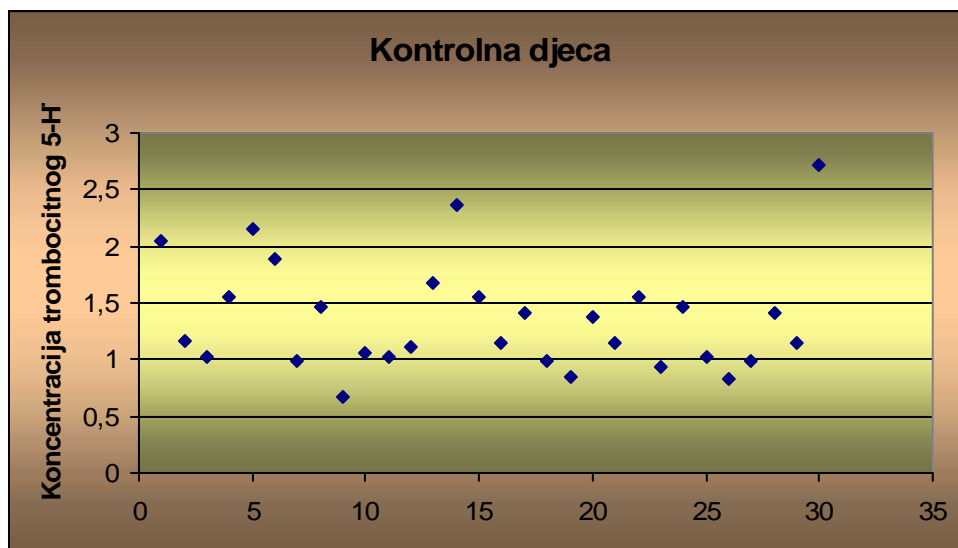
Slika 4.7. Individualni podaci za dob u djece s ADHD



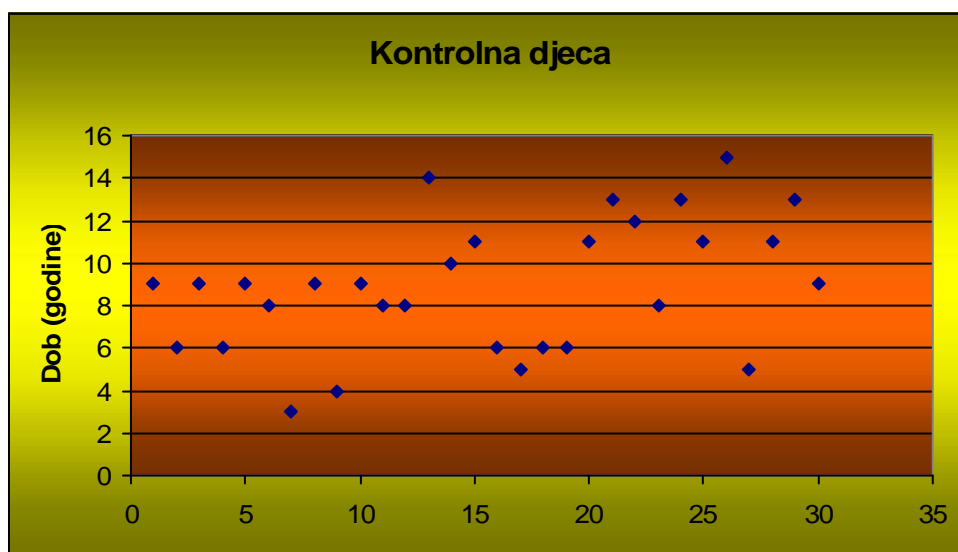
4.7 KORELACIJA IZME U DOBI I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA U KONTROLNE DJECE

Istražili smo korelaciju izme u koncentracije trombocitnog 5-HT i dobi kod kontrolne djece. Slika 8. prikazuje individualne vrijednosti za trombocitni 5-HT u kontrolne djece, dok slika 9. prikazuje individualne vrijednosti za dob u kontrolne djece. Nije bilo zna ajne korelacije izme u koncentracije trombocitnog 5-HT i dobi kod kontrolne zdrave djece. Pearsonov test korelacije pokazao je da ne postoji zna ajna ($r=0.217$; $p=0.249$) povezanost (korelacija) izme u koncentracije trombocitnog 5-HT i dobi kod kontrolne djece.

Slika 4.8. Individualni podaci za vrijednosti trombocitnog serotonina u kontrolne djece



Slika 4.9. Individualni podaci za dob u kontrolne djece



5 RASPRAVA

5.1 KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJECE S ADHD I U ZDRAVE DJECE

Rezultati ove studije, provedenoj na pažljivo odabranim skupinama muške i ženske djece oboljele od ADHD poremećaja i zdrave (kontrolne) djece, pokazali su da nema značajne razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između djece s ADHD poremećajem i zdrave djece. Naši su rezultati usklađeni sa podacima istraživanja koji ističu koncentraciju 5-HT kod djece s ADHD prema kontrolnoj djeci (Cook i sur., 1995; Unis i sur., 1997; Hercigonja-Novković i sur., 2009), ili sa nepromijenjenim omjerom serotonina i trombocita kod bolesnika s ADHD poremećajem u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Comings, 1993).

Iako je poznato da 5-HT utječe na antisocijalno i agresivno ponašanje (Goveas i sur., 2004; Popova, 2006), te da se koncentracija trombocitnog 5-HT može koristiti kao pokazatelj promijenjenog ponašanja (Goveas i sur., 2004), naši rezultati nisu bili usklađeni s promijenjenom koncentracijom trombocitnog 5-HT u agresivnih ispitanika (Goveas i sur., 2004). Međutim, nedavno je pokazano kako se koncentracija trombocitnog 5-HT ne razlikuje između djece s ADHD podijeljene prema podtipu ADHD na one sa nepažnjom, hiperaktivnošću ili kombiniranim podtipom ADHD (Hercigonja-Novković i sur., 2009). Ti podaci, s našim podacima, upućuju na pretpostavku da različiti podtipovi ADHD, ili sama dijagnoza ADHD, nije vezana za promijenjenu koncentraciju trombocitnog 5-HT. Rezultati naše studije ne slažu se s podacima istraživanja koji su pokazali da se u djece s ADHD javlja niža koncentracija trombocitnog 5-HT u odnosu na kontrolnu djecu (Comings, 1993), ili s izjavama koje pokazuju snižene (Rapoport i

sur., 1974), ali i povećane (Rogeness i sur., 1992) pokazatelje periferne funkcije 5-HT kod ADHD poremećaja.

Neslaganja u nalazima povezana s trombocitnim 5-HT sadržanim kod ADHD poremećaja mogu biti objašnjena različitim utjecajem rase i etnološkog podrijetla na koncentraciju trombocitnog 5-HT, prethodno otkrivenim kod psihijatrijskih pacijenata predpubertetske dobi i kod zdrave djece (Pfeffer i sur., 1998). Kako bi kontrolirali te imbenike koji mogu utjecati na koncentraciju trombocitnog 5-HT, u našim istraživanjima su djeca bila iste rase (bijelci) i istog etnološkog podrijetla. Izostanak otkrivanja značajnih razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između kontrolne djece i djece s ADHD poremećajem može biti povezan sa smanjenom snagom statističkih testova upotrijebljenih u statističkoj obradi podataka, budući da je naše istraživanje uključivalo manji broj (N=30) kontrolne djece.

Na trombocitni 5-HT mogu utjecati i drugi različiti imbenici kao što su dob, spol, godišnje doba, dužina dnevnog svjetla, korištenje lijekova, pušenje i različite komorbidne psihijatrijske dijagnoze i patološka ponašanja. U odraslih osoba godišnja doba ne utječe na koncentraciju trombocitnog 5-HT (Jakovljević i sur., 1997), tako da je potencijalni sezonski utjecaj na koncentraciju trombocitnog 5-HT isključen. U tom istraživanju pokazano je kako zdravi ispitanici imaju približno jednaku koncentraciju trombocitnog 5-HT za vrijeme različitih sezona (Jakovljević i sur., 1997). No i dužina dnevnog svjetla može utjecati na koncentraciju trombocitnog 5-HT (Ljubić i sur., 2007). U zdravih ispitanika taj je u inak dnevnog svjetla pokazan samo kod zdravih odraslih muškaraca, dokim kod zdravih odraslih žena nema značajnog utjecaja dnevnog svjetla na koncentraciju trombocitnog 5-HT (Ljubić i sur., 2007). Dakle ti podaci upućuju da bi se i koncentracija trombocitnog 5-HT kod djece s ADHD poremećajem ili kod zdravih djece mogla razlikovati ako su njihovi uzorci prikupljeni tijekom ljeta. Upravo radi te činjenice se tijekom ljeta, kada je dužina dnevnog svjetla najduža, ne prikupljaju uzorci za istraživanje koncentracije trombocitnog 5-HT.

Koncentracija trombocitnog 5-HT se ne mijenja prema dnevnom ritmu i stabilna je tijekom dana (Muck-Šeler i sur., 2001). Osim toga, u našem je istraživanju

prikupljanje uzoraka krvi bilo u injeno u 8.00 sati ujutro, dakle uvijek u isto vrijeme, kako bi se izbjegao bilo kakav utjecaj dnevnih varijacija na koncentraciju trombocitnog 5-HT. Kod određivanja razine hormona u krvi bi taj utjecaj dnevnih fluktuacija bio značajan, no pri mjerenju koncentracije trombocitnog 5-HT u samo jednoj vremenskoj točki, budući da je ta koncentracija stabilna, nema potencijalnog ograničenja istraživanja. U prilog toj pretpostavci govore i podaci o stabilnosti koncentracije trombocitnog 5-HT u dječaka sa ADHD starih 8 godina, jer se te vrijednosti nisu razlikovale u istih dječaka starih 11 godina (Pick i sur., 1999).

Iako su neka starija djeca možda pušila cigarete, sva su djeca nijekala da su pušila, a i dokazano je da pušenje ne utječe na koncentraciju trombocitnog 5-HT u zdravih odraslih osoba (Kováč i sur., 2008).

Na koncentraciju trombocitnog 5-HT mogu utjecati određeni simptomi koje se javljaju kao dio kliničke slike psihijatrijskih bolesti (Muck-Šeler i sur., 2005; Pivac i sur., 2006b). Povećana koncentracija trombocitnog 5-HT može biti povezana s prisutnošću psihotičnih simptoma (Muck-Šeler i sur., 1996; Pivac i sur., 1997a; Muck-Šeler i sur., 2005; Pivac i sur., 2006a; 2006b; Kováč i sur., 2008) ili psihotičke sumanute i iskrivljene slike realiteta i halucinacija (Pivac i sur., 2006a), među ostalim dijagnostičkim instrumentima kao što su klinički intervju, fizički pregled i Connersova mjerna ljestvica za roditelje i učitelje isključili su prisutnost tih simptoma.

Koncentracija trombocitnog 5-HT može biti promijenjena u odraslih osoba sa agresivnim ponašanjem (Goveas i sur., 2004), no budući da naša skupina djece s ADHD poremećajem nije evaluirana na prisutnost agresije pomoću određenih psihologijskih skala i upitnika, na temelju naših rezultata ne možemo zaključivati o promjenama koncentraciju trombocitnog 5-HT u agresiji. Naši podaci upućuju da djeca s ADHD vjerojatno nisu bila agresivna, budući da je njihova koncentracija trombocitnog 5-HT bila nepromijenjena u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini djece.

5.2 NEDOSTATAK SPOLNO IZAZVANIH PROMJENA U KONCENTRACIJI TROMBOCITNOG SEROTONINA U DJE AK A I DJEVOJ ICA S ADHD I KONTROLNIH DJE AK A I DJEVOJ ICA

Mjerenjem koncentracije trombocitnog 5-HT u dje aka i djevoj ica, dobiveni su rezultati koji pokazuju da nema zna ajnih razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT izme u dje aka i djevoj ica oboljelih od ADHD ili izme u kontrolnih dje aka i djevoj ica. Ti su rezultati u skladu sa istraživanjem koje je obuhvatilo ve e skupine djece s ADHD ili kontrolne djece (Hercigonja-Novkovi i sur., 2009). U odraslih osoba postoje spolom izazvane promjene u koncentraciji trombocitnog 5-HT izme u muškaraca i žena i to je pokazano u zdravih ispitanika (Muck-Šeler i sur., 1996; Pivac i sur., 2001), u depresivnih bolesnika (Muck-Šeler i sur., 1996; 2005), u shizofrenih bolesnika (Muck-Šeler i sur., 1999; Pivac i sur., 2006b) i u ovisnika o alkoholu (Pivac i sur., 2001; Pivac i sur., 2007; Pivac i sur., 2008). U našem istraživanju kod dje aka i djevoj ica nisu prona ene spolne razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT, prethodno prona ene kod odraslih osoba (Muck-Šeler i sur., 1996; Pivac i sur., 2001; 2008). Taj bi se nedostatak spolno izazvanih promjena u koncentraciji trombocitnog 5-HT mogao objasniti injenicom da su djeca s ADHD poreme ajem uklju ena u ovom istraživanju bila stara od 4-15 godina i od ukupno 79 djece je samo etvero djece bilo staro 12 godina, troje djece 13 godina i po jedno dijete 14 i jedno 15 godina, dakle u dobi kada po inje spolno sazrijevanje. Kontrolna djeca su tako er bila u dobi od 4-15 godina, no u toj skupini od 30 djece je još manje djece bilo u fazi puberteta jer je samo jedno dijete bilo staro 12 godina, troje djece je bilo staro 13 godina i po jedno dijete je imalo 14 i 15 godina. Radi toga nije bilo zna ajnih razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT izme u dje aka i djevoj ica s ADHD poreme ajem.

Budu i su skupine djece bile uskla ene, izostanak razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT nije vezan za promjenama u 5-HT funkcije vezane uz dob (Halperin i sur., 1997).

5.3 ADHD I RAZLIKITE PSIHIJATRIJSKE BOLESTI

ADHD je poremećaj u kojem se najčešće javljaju simptomi nepažnje, hiperaktivnosti i impulzivnosti, a smatra se da ključnu ulogu u nastanku ADHD ima osim dopamina i 5-HT (Comings, 2001; Rothenberger i sur., 2004). Djeca koja boluju od ADHD često su impulzivna i agresivna, a to su ponašanja posredovana 5-HT sustavom. Promjene u 5-HT sustavu povezane su s oštećenjima pamćenja, kognitivnim poremećajima i s povećanjem agresivnosti (Goveas i sur., 2004). Kod osoba s antisocijalnim i agresivnim ponašanjem javlja se niža koncentracija 5-HT nego kod neagresivnih pojedinaca (Coccaro i sur., 1989).

Postoje istraživanja koja pokazuju da je 5-HT važan za razvoj različitih patoloških oblika ponašanja koja se često se javljaju u različitim psihijatrijskim bolestima, a koja su povezana sa smanjenim funkcioniranjem serotoniniskog sustava (Dubovsky i Thomas, 1995; Mueller-Oerlinghausen i sur., 2004). Naime osobe koje pokazuju antisocijalno i agresivno ponašanjem imaju sniženu koncentraciju 5-HT u usporedbi s neagresivnim pojedincima (Coccaro i sur., 1989).

Neka istraživanja podupiru hipotezu da su biološki pokazatelji, uključujući i periferne pokazatelje 5-HT funkcije, možda snažnije povezani s osnovnim psihopatološkim simptomima, poput impulzivnosti, nego sa aktualnim dijagnostičkim kategorijama, kao što je ADHD (Manuck i sur., 1998; Askenazy i sur., 2000; Goveas i sur., 2004; Mueller-Oerlinghausen i sur., 2004; Schmitt i sur., 2006). Nedavno je pokazano da impulzivna djeca s ADHD poremećajem imaju veće u koncentraciju trombocitnog 5-HT nego neimpulzivna djeca s ADHD poremećajem (Hercigonja-Novković i sur., 2009). Budući da se koncentracija trombocitnog 5-HT povezuje s impulzivnošću, ali ne i s nepažnjom ili hiperaktivnošću kod djece s ADHD poremećajem (Hercigonja-Novković i sur., 2009), ovi podaci potvrđuju hipotezu da povećana koncentracija trombocitnog 5-HT može biti pokazatelj impulzivnosti (Askenazy i sur., 2000). Budući da središnji 5-HT sustav nadzire impulzivnost (Pattij i Vanderschuren, 2008), promjene koncentracije perifernog, trombocitnog 5-HT upućuju na zaključak da se koncentracija trombocitnog 5-HT može koristiti kao pokazatelj određenih ponašanja koja su promijenjena u ADHD.

Uz ADHD pojavljuju se često i druge psihičke bolesti (komorbiditeti). Koriste li trombocite kao periferni model za središnje serotoninske sinaptosome, istraživanja su pokazala povišenu koncentraciju trombocitnog serotonina u shizofrenih (Muck-Šeler i sur., 1999), depresivnih bolesnika s predominantno psihotičkim simptomima (Muck-Šeler i sur., 1996; Pivac i sur., 1997a), ispitanika s posttraumatskim stresnim poremećajem koji su razvili psihotičke simptome (Pivac i sur., 2006a), te sniženu koncentraciju trombocitnog serotonina u suicidalnom ponašanju (Muck-Šeler i sur., 1996; Pivac i sur., 1997b; Marinko i sur., 2007; Kovačić i sur., 2008). U skupinu djece koja su sudjelovala u istraživanjima nisu bila uključena ona djeca koja su uz ADHD bolovala od drugih psihijatrijskih bolesti kao što su komorbidna depresija, shizofrenija, ili posttraumatski stresni poremećaj. Prema tome, nije bilo komorbidnih psihijatrijskih bolesti koje bi mogle utjecati na koncentraciju trombocitnog 5-HT kod istraživane djece.

Na povezanost u stalnost oboljenja djece od ADHD može utjecati i zloraba alkohola u roditelja. Naime, postoje istraživanja koja pretpostavljaju da se ADHD javlja češće kod djece čiji su roditelji bili alkoholičari (Earls i sur., 1988). Budući da je alkoholizam povezan sa smanjenjem središnje serotoninske funkcije (Berglund i sur., 2006), možda bi zloraba alkohola u roditelja ispitanika iz naše studije mogla biti uzrokom razvoja ADHD u djece. Nedostatak ovog istraživanja jest da roditelji djece s ADHD poremećajem nisu ispitivani o zlorabi alkohola ili ovisnosti o alkoholu. Prema tome, ne možemo isključiti mogućnost da su djeca uključena u studiju imala roditelje koji su bili ovisnici o alkoholu. No, prilikom psihijatrijskog intervjua s roditeljima djece oboljele od ADHD, prikupljeni su podaci o njihovom socijalnom statusu. Sva djeca koja su bila uključena u studiju, potjecala su iz domova u kojem su oba roditelja živjela zajedno. Dakle, djeca s ADHD nisu dolazila iz razrušenih domova, a moguća ovisnost o alkoholu ili kronični alkoholizam bi utjecao na stabilnost obitelji i sigurnost domova. Prema tim podacima, čini se da djeca u našoj studiji najvjerojatnije nisu imala roditelje koji su bili ovisnici o alkoholu. Drugi čimbenici, kao što su otrovanje olovom, pušenje u trudnoći, alkoholizam u trudnoći, niska porođajna težina, štetni aditivi u hrani, komplikacije pri porodu (toksemije, eklampsije, loše zdravlje majke, starija dob, poremećeno fetalno sazrijevanje, produženo trajanje poroda, fetalni distress, smanjena

poro ajna težina, postporo ajno krvarenje) mogu biti uzrokom ADHD (Biederman, 2005), no ti demografski podaci u ovoj studiji nisu prikupljeni.

U zaklju ku, rezultati studije su pokazali sli nu koncentraciju trombocitnog 5-HT me u skupinama muške i ženske djece oboljele od ADHD poreme aja i zdrave (kontrolne) djece. Nisu prona ene spolno izazvane razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT izme u muške i ženske djece, i to niti kod oboljelih od ADHD, niti u zdrave kontrolne djece. Ti podaci upu uju na zaklju ak da se koncentracija trombocitnog 5-HT ne razlikuje izme u oboljelih od ADHD i odgovaraju e zdrave kontrolne skupine, odnosno da dijagnoza ADHD nije vezana za promijenjenu koncentraciju trombocitnog 5-HT. Sukladno tome, koncentracija trombocitnog 5-HT ne može se koristiti kao periferni biološki pokazatelj ADHD. Ti su podaci uskla eni sa literaturnim, koji upu uju na zaklju ak da su periferni biološki pokazatelji, kao što je koncentracija trombocitnog 5-HT, povezani sa promjenama odre enih, specifi nih skupina simptoma ili odre enog ponašanja ili karakteristika li nosti, promijenjenih u ADHD.

6 ZAKLJUČAK

1. Koncentracija trombocitnog 5-HT nije se značajno razlikovala između muške i ženske djece oboljele od ADHD poremećaja i zdrave (kontrolne) djece.
2. Nisu pronađene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između muške i ženske djece s ADHD.
3. Nisu pokazane značajne razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između zdrave kontrolne muške i ženske djece.
4. Budući da je ADHD kompleksan psihijatrijski poremećaj, u kojem dominiraju tri karakteristične skupine simptoma: nepažnja, hiperaktivnost i impulzivnost, i iako neurobiološka podloga nije potpuno jasna, rezultati naše studije upućuju da se koncentracija trombocitnog 5-HT ne može koristiti kao periferni biokemijski pokazatelj koji bi uputio na sigurnu dijagnozu ADHD.
5. Kako se koncentracija 5-HT u trombocitima razlikuje u osoba s određenim simptomima, s određenim ponašanjem ili karakteristikama ličnosti, periferni biološki pokazatelj odnosno koncentracija trombocitnog 5-HT može se koristiti kao pokazatelj određenih, specifičnih skupina simptoma, simptoma određenog ponašanja ili karakteristika ličnosti, promijenjenih u ADHD.

7 LITERATURA

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. *American Psychiatric Press*, Washington, DC.

Andres, A.H., Rao, M.A., Ostrowitzki, S. i Enzian, W. (1993). Human brain cortex and platelet serotonin₂ receptor binding properties and their regulation by endogenous serotonin. *Life Sci* 52, 313-321.

Arnsten, A., Steere, J. i Hunt, R. (1996). The contribution of α -2 noradrenergic mechanisms to prefrontal cortical cognitive function: Potential significance to attention deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53, 448–455.

Artigas, F., Sarrias, M.J., Martinez, E. i Gelpi, E. (1985). Serotonin in body fluids: Characterization of human plasmatic and cerebrospinal fluid pools by means of a new HPLC method. *Life Sci* 37, 441-447.

Askenazy, F., Caci, H., Myquel, M., Darcourt, G. i Lecrubier, Y. (2000). Relationship between impulsivity and platelet serotonin content in adolescents. *Psychiatry Res* 94, 19-28.

Austin, M.C., Bradely, C.C., Mann, J.J. i Blakely, R.D. (1994). Expression of serotonin transporter messenger RNA in the human brain. *J Neurochem* 62, 2362-2367.

Berglund, K.C., Fahlke, C., Berggren, U., Eriksson, M. i Balldin, J. (2006). Personality profile in type I alcoholism: long duration of alcohol intake and low serotonergic activity are predictive factors of anxiety proneness. *J Neural Transm* 113, 1287–1298.

Biederman, J. (2005). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview. *Biol Psychiatry* 57, 1215-1220.

Bulat, M., Geber, J. i Lackovi, Z. (1999). Medicinska farmakologija. Medicinska naknada, Zagreb.

Camacho, A. i Dimsdale, J.E. (2000). Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom Medicine* 62, 326-336.

Coccaro, E.F., Kavoussi, R.J., Sheline, Y.I., Lish, J.D. i Csernansky, J.G. (1996). Impulsive aggression in personality disorder correlates with tritiated paroxetine binding in the platelet. *Arch Gen Psychiatry* 53, 531-536.

Coccaro, E.F., Siever, L.J., Klar, H.M., Maurer, G., Cocharane, K., Cooper, T.B., Mohs, R.C. i Davis K.L (1989). Serotonergic studies of personality disorder: Correlates with behavioral aggression and impulsivity. *Arch Gen Psychiatry* 46, 587-599.

Cook, E.Jr., Stein, M.A., Ellison, T., Unis, A.S. i Leventhal, B.L. (1995). Attention deficit hyperactivity disorder and whole blood serotonin levels: Effects of comorbidity. *Psychiatry Res* 57, 13–20.

Comings, D.E. (1993). Serotonin and the biochemical genetics of alcoholism: lessons from studies of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and Tourette syndrome. *Alc Alcoholism* (Oxford, Oxfordshire) 2, 237-241.

Comings, D.E. (2001). Clinical and Molecular Genetics of ADHD and Tourette Syndrome: Two Related Polygenic Disorders. *Ann NY Acad Sci* 931, 50-83.

Conners, C.K. (1998). Rating scales in attention deficit/hyperactivity disorder: use in assessment and treatment monitoring. *J Clin Psychiatry* 58, 24-30.

Da Prada, M., Cesura, A.M., Launay, J.M. i Richards, J.G. (1988). Platelets as models for neurons? *Exp Res* 44, 115–126.

DiMaio, S., Grizenko, N. i Joober, R. (2003). Dopamine genes and attention-deficit hyperactivity disorder: a review. *J Psychiatry Neurosci* 28, 27-38.

Dolan, M., Deakin, W.J.F., Roberts, N. i Anderson, I. (2002). Serotonergic and cognitive impairments in impulsive aggressive personality disordered offenders: are there implications for treatment? *Psychol Med* 32, 105–117.

Dubovsky, S.L. i Thomas, M. (1995). Beyond specificity: Effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. *J Psychosom Res* 39, 429-444.

Earls, F., Reich, W., Jung, K.E. i Cloninger, R. (1988). Psychopathology in children of alcoholic and antisocial parents. *Alcohol Clin Exp Res* 12, 481–487.

Erspamer, V. i Asero, B. (1952). Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffin cells, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800-801.

Fuller, R.W. (1986). Biochemical pharmacology of the serotonin system. *Adv Neurol* 43, 469-471.

Fung, Y.K. i Lau, Y.S. (1989). Effects of prenatal nicotine exposure on rat striatal dopaminergic and nicotinic systems, *Pharmacol Biochem Behav* 33, 1–6.

Goveas, J.S., Csernansky, J.G. i Coccaro, E.F. (2004). Platelet serotonin content correlates inversely with life history of aggression in personality-disordered subjects. *Psychiatry Res* 126, 23-32.

Halperin, J.M. Newcorn, J.H., Schwartz, S.T., Sharma, V., Siever, L.J., Koda, V.H. i Gabriel, S. (1997). Age-related changes in the association between serotonergic function and aggression in boys with ADHD. *Biol Psychiatry* 41, 682–689.

Hercigonja Novkovi , V., Rudan, V., Pivac, N., Nedi , G. i Muck-Šeler, D. (2009). Platelet serotonin concentration in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology*, 59, 17-22.

Hervig, T.A., Farstad, M. i Vollset, S.E. (1996). Endogenous serotonin in human blood platelets-factors that may influence reference values. *Platelets* 7, 47-52.

Hrdina, P.D. (1994). Platelet serotonergic markers in psychiatric disorders: use, abuse and limitations. *J Psychiatry Neurosci* 19, 87-88.

Jakovljevi , M., Muck-Šeler, D., Pivac, N., Ljubi i , D., Bujas, M. i Dodig, G. (1997). Seasonal influence on platelet 5-HT levels in patients with recurrent major depression and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 41, 1028-1034.

Kema, I.P., de Vries, E.G.E. i Muskiet, F.A.J. (2000). Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J Chromatography B* 747, 33-48.

Kocijan-Hercigonja, D., Faber, B., Folnegovi -Šmalc, V., Gotovac, K., Henigsberg, N., Hercigonja Novkovi , V., Lackovic, Z., Matijevi Maši , Lj. i Šimi G. (2006). Biološke osnove i terapija ponašanja. *Školska knjiga*, Zagreb, 1-255.

Kocijan-Hercigonja, D. i Karlovi , D. (1999). Psihofarmakoterapija poreme aj a pažnje s hiperaktivnoš u. *Pediatry Rev* 43, 181-183.

Kornetsky, C. (1970). The psychopharmacology of the immature organism. *Psychopharmacologia* 17, 105–136.

Kovačič, Z., Henigsberg, N., Pivac, N., Nedić, G. i Borovečki A. (2008). Platelet serotonin concentration and suicidal behaviour in combat related posttraumatic stress disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 32, 544-551.

Lesch, K.P., Baling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B., Murphy, D.L. i Riederer, P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm* 95, 157-162.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.S., Farr, A.C. i Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44, 151-162.

Ljubić, M., Stipčević, T., Pivac, N., Jakovljević, M. i Muck-Šeler, D. (2007). The influence of daylight exposure on platelet 5-HT levels in patients with major depression and schizophrenia. *J Photchem Photobiol B: Biology*, 89, 63-69.

Marinko, D., Pivac, N., Martinac, M., Jakovljević, M., Mihaljević-Pešić, A. i Muck-Šeler, D. (2007). Platelet serotonin and serum cholesterol concentrations in suicidal and non-suicidal male patients with first episode of psychosis. *Psychiatry Res* 150, 105-108.

Mann, J.J. (2002). A current perspective of suicide and attempted suicide. *Ann Int Med* 136, 302-311.

Mann, J.J. (1998). Neurobiology of suicide. *Nature Med* 4, 25-30.

Mann, J.J. (2003). Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Rev Neurosci* 4, 819-828.

Manuck, S.B., Flory, J.D., McCaffery, J.M., Matthews, K.A., Mann, J.J. i Muldoon, M.F. (1998). Aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity in a nonpatient sample. *Neuropsychopharmacology*, 19, 287-299.

Mattson, M.P., Maudsley, S. i Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27, 589-594.

Moeller, F.G. i Dougherty, D.M. (2001). Antisocial personality disorder, alcohol, and aggression. *Alc Res Health* 25, 5-11.

Muck-Šeler, D., Jakovljevi , M. i Pivac, N. (1996). Platelet 5-HT concentrations and suicidal behavior in recurrent major depression. *J Affect Disord* 39, 73-80.

Muck-Šeler, D., Pivac, N. i Jakovljevi , M. (1999). Sex differences, season of birth and platelet 5-HT levels in schizophrenic patients. *J Neural Transm* 106, 337-347.

Muck-Šeler, D., Pivac, N. i Jakovljevi , M. (2001). The influence of acute paroxetine treatment on peripheral biochemical markers in depressed patients. *World J Biol Psychiatry* 2, Supplement 1, P025-59.

Muck-Šeler, D., Pivac, N., Šagud, M., Jakovljevi , M. i Mihaljevi -Peleš, A. (2002). The effects of paroxetine and tianeptine on peripheral biochemical markers in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr* 26, 1235-1243.

Muck-Šeler, D., Pivac, N., Šagud, M., Mustapi , M. i Jakovljevi , M. (2005). The effects of serotonin uptake inhibitors on platelet serotonin: From basic to clinical studies. In Shirley AC (Ed.), Trends in serotonin uptake inhibitors research, *NOVA Science Publishers, Inc, NY, Hauppauge, USA*, 29-53.

Mueller-Oerlinghausen, B., Roggenbach, J. i Franke, L. (2004). Serotonergic platelet markers of suicidal behavior – do they really exist? *J Affect Disord* 79, 13-24.

Ortiz, J., Artigas, F. i Gelpi, E. (1998). Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 43, 983-990.

Pattij, T. i Vanderschuren, L.J.M.J. (2008). The neuropharmacology of impulsive behaviour. *Trends Pharmacol Sci* 29, 192-199.

Pfeffer, C.R., McBride, P.A., Anderson, G.A., Kakuma, T., Fensterheim, L. i Khait, V. (1998). Peripheral serotonin measures in prepubertal psychiatric inpatients and normal children: associations with suicidal behaviour and its risk factors. *Biol Psychiatry* 44, 568-577.

Pick, L.H., Halperin, J.M., Schwartz, S.T. i Newcorn, J.H. (1999). A longitudinal study of neurobiological mechanisms in boys with attention-deficit hyperactivity disorder: preliminary findings. *Biol Psychiatry* 45, 371-373.

Pivac, N., Muck-Šeler, D. i Jakovljevi, M. (1997a). Platelet 5-HT levels and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in schizophrenic patients with positive and negative symptoms. *Neuropsychobiology* 36, 19-21.

Pivac, N., Jakovljevi, M., Muck-Šeler, D. i Brzovi, Z. (1997b). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and platelet serotonin concentrations in depressed patients. *Psychiatry Res* 73, 123-132.

Pivac, N., Muck-Šeler, D., Bariši, I., Jakovljevi, M. i Pureti, Z. (2001). Platelet serotonin concentration in dialysis patients with somatic symptoms of depression. *Life Sci* 68, 2423-2433.

Pivac, N., Muck-Šeler, D., Šagud, M., Jakovljević, M., Mustapić, M. i Mihaljević-Peleš, A. (2003). Long-term sertraline treatment and peripheral biochemical markers in female depressed patients. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr* 27, 759-765.

Pivac, N., Muck-Šeler, D., Mustapić, M., Šagud, M., Marinko, D., Deželjin, M. i Jakovljević, M. (2006b). Peripheral biological markers and treatment response in schizophrenia, U: French DP (urednik) *Schizophrenic Psychology: New Research*. New York, *Nova Science Publishers* str. 319-370.

Pivac, N., Kozarić-Kovačević, D., Mustapić, M., Deželjin, D., Borovečki, A., Grubišić-Ilić, M. i Muck-Šeler, D. (2006a). Platelet serotonin in combat related posttraumatic stress disorder with psychotic symptoms. *J Affect Disord* 93, 223-227.

Pivac, N., Kozarić-Kovačević, D., Mustapić, M., Deželjin, M., Nenadić-Šviglin, K. i Muck-Šeler, D. (2007). New research on alcohol abuse and alcoholism (Peripheral biological markers in alcoholism) Chapter I. U: *Drug and Alcohol abuse Research Focus*. Walcott, Terry A. (urednik): *New York, Nova Publishers*, str. 1-62.

Pivac, N., Kozarić-Kovačević, D., Mustapić, M., Deželjin, M., Nenadić-Šviglin, K. i Muck-Šeler, D. (2008). *Peripheral biological markers in alcoholism*. Pivac, N. (urednik): *New York, Nova Publishers*, str 1-93.

Pletscher, A. (1968). Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Brit J Pharmac Chemother* 32, 1-16.

Pletscher, A. (1987). The uptake system of 5-hydroxytryptamine in blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int J Cardiol* 14, 177-188.

Pliszka, S.R., Rogeness, G.A., Renner, P., Sherman, J. i Broussard, T. (1988). Plasma neurochemistry in juvenile offenders. *J Am Acad Child Adolesc Psych* 25, 588-594.

Pliszka, S., McCracken, J. i Maas, J. (1996). Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: Current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35, 264–272.

Popova, N.K. (2006). From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioassays* 28, 495-503.

Rapoport, J., Quinn, N., Scribanu, N. i Murphy, D.L. (1974). Platelet serotonin of hyperactive school age boys. *Br J Psychiatry* 125, 138–140.

Rogeness, G.A., Javors, M.A. i Pliszka, S.R. (1992). Neurochemistry of child and adolescent psychiatry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiat* 31, 765-781.

Rothenberger, A., Doepfner, M., Sergeant, J. i Steinhaus, H.C. (2004). ADHD - beyond core symptoms. Not only a European perspective. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13, 1-130.

Sandler, M., Reveley, M.A. i Glover, V. (1981). Human platelet monoamine oxidase activity in health disease: a review. *J Clin Pathol* 34, 292-297.

Sarne, Y., Mandel, J., Goncalves, M.H., Brook, S., Gafni, M. i Elizur, A. (1995). Imipramine binding to blood platelets and aggressive behaviour in offenders, schizophrenics and normal volunteers. *Neuropsychobiology* 31, 120-124.

Schmidt, L.G., Dufeu, P., Heinz, A., Kuhn, S. i Rommelspacher, H. (1997). Serotonergic dysfunction in addiction - effects of alcohol, cigarette smoking and heroin on platelet 5-HT content. *Psychiatry Res* 72, 177-185.

Schmitt, J.A.J., Wingen, M., Ramaekers, J.G., Evers, J.G. i Riedel, W.J. (2006). Serotonin and human cognitive performance. *Curr Pharmaceut Design* 12, 2473-2486.

Soloff, P.H., Lynch, K.G. i Moss, H.B. (2000). Serotonin, impulsivity, and alcohol use disorders in the older adolescent: A psychobiological study. *Alcohol Clin Exp Res* 24, 1609-1619.

Stahl, S.M. (1985). Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons; in Longenecker GL (ed): Platelets: Physiology and Pharmacology. New York, *Academic Press* 307-340.

Stahl, S.M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord* 51, 215-235.

Thomas, J.D., Garrison, M.E., Slawecki, C.J., Ehlers, C.L. i Riley, E.P. (2000). Nicotine exposure during the neonatal brain growth spurt produces hyperactivity in preweanling rats: a review. Center for Behavioral Teratology, San Diego State University, *Neurotoxicol Teratol* 22, 695-701.

Trimble, M.R. (1996). *Biological Psychiatry*, Second edition. Chichester: John Wiley & Sons.

Twitchell, G.R., Hanna, G.L., Cook, E.H., Fitzgerald, H.E., Little, K.Y. i Zucker, R.A. (1998). Overt behavior problems and serotonergic function in middle childhood among male and female offspring of alcoholic fathers. *Alcohol Clin Exp Res* 22, 1340-1348.

Unis, A.S., Cook, E.H., Vincent, J.G., Gjerde, D.K., Perry, B.D., Mason, C. i Mitchell, J. (1997). Platelet serotonin measures in adolescents with conduct disorder. *Biol Psychiatry* 42, 553-559.

Van De Kamp, J. i Collins, A. (1994). Prenatal nicotine alters nicotinic receptor development in the mouse brain, *Pharmacol Biochem Behav* 47, 889–900.

Van Praag, H.M. (2004). The cognitive paradox in posttraumatic stress disorder: a hypothesis. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr* 28, 923-935.

Wade, P.R., Chen, J., Jaffe, B., Kassem, I.S., Blakely, R.D. i Gershon, M.D. (1996). Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 16, 2352-2364.

Wong, A.H.C. i Van Tol, H.H.M. (2003). Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 269-306.

Zametkin, A.J. i Rapoport, J.L. (1987). Noradrenergic hypothesis of attention deficit with hyperactivity A critical review. In: H.Y. Meltzer, Editor, *Psychopharmacology The Third Generation of Progress*, Raven Press, New York, 837–842.